

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ **Patentschrift**
⑯ **DE 102 14 095 C 1**

⑯ Int. Cl.⁷:

C 12 N 5/08

⑯ Aktenzeichen: 102 14 095.2-41
⑯ Anmeldetag: 28. 3. 2002
⑯ Offenlegungstag: -
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 25. 9. 2003

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:

Kremer, Bernd Karl Friedrich, Prof. Dr.med., 24107
Kiel, DE

⑯ Vertreter:

Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

⑯ Erfinder:

Kremer, Bernd Karl Friedrich, Prof., Dr.med., 24107
Kiel, DE; Faendrich, Fred, Prof., Dr.med., 24105 Kiel,
DE; Schulze, Maren, Dr., 24105 Kiel, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

WO 00 70 022 A2

⑯ Dedifferenzierte, programmierbare Stammzellen monozytären Ursprungs, sowie deren Herstellung und
Verwendung

⑯ Die Erfindung betrifft die Herstellung von dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen aus menschlichen Monozyten durch Kultivieren von Monozyten in einem Kulturmedium, welches M-CSF und IL-3 enthält. Die Erfindung betrifft ferner pharmazeutische Präparate, welche die dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen enthalten sowie die Verwendung dieser Stammzellen zur Herstellung von Zielzellen und Zielgewebe.

[0001] Die Erfindung betrifft dedifferenzierte, programmierbare Stammzellen abgeleitet von humanen Monozyten, sowie deren Herstellung und deren Verwendung zur Herstellung von Körperzellen und Geweben. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich um autologe humane Stammzellen, d. h. die monozytäre Ursprungszelle stammt von demjenigen Patienten, der mit der aus der Ursprungszelle hervorgegangen Stammzelle bzw. mit den aus dieser Stammzelle hervorgegangenen Körperzellen therapiert werden soll.

[0002] Als "Stammzellen" werden solche Zellen bezeichnet, welche (a) die Fähigkeit zur Selbst-Vermehrung und (b) die Fähigkeit zur Als "Stammzellen" werden solche Zellen bezeichnet, welche (a) die Fähigkeit zur Selbst-Vermehrung und (b) die Fähigkeit zur Bildung mindestens eines und vielfach zahlreicher spezialisierter Zelltypen besitzen [vergl. Peter J. Donovan und John Gearhart, *Nature* 414, 92–97, (2001)]. Als "pluripotent" werden Stammzellen bezeichnet, die sich in im wesentlichen alle denkbaren Zelltypen des menschlichen und tierischen Körpers differenzieren können. Derartige Stammzellen sind bisher nur aus embryonalem Gewebe bzw. aus embryonalem Karzinom (testikulären Tumoren) erhältlich (vergl. a. a. O.). Die Verwendung embryonaler Stammzellen wird in der Öffentlichkeit insbesondere in Deutschland umfangreich diskutiert und als außerordentlich problematisch betrachtet. Neben der mit embryonalen Stammzellen verbundenen ethischen und rechtlichen Problematik, stößt auch der therapeutische Einsatz derartiger Zellen auf Schwierigkeiten. Naturgemäß stammen embryonale Stammzellen von Spender-Organismen, die gegenüber den potentiellen Empfängern von aus diesen Zellen hervorgegangenen differenzierten Zellen oder Gewebe (nachfolgend als Zielzellen oder Zielgewebe bezeichnet), heterolog sind. Es ist somit zu erwarten, daß derartige Zielzellen in den potentiellen Empfängern eine immunologische Sofortantwort im Sinne der Abstoßung auslösen werden.

[0003] Stammzellen lassen sich auch aus verschiedenen Geweben adulter, d. h. ausdifferenzierter Individuen isolieren. Derartige Stammzellen werden als "multipotente adulte Stammzellen" bezeichnet. Sie spielen im Körper eine Rolle bei der Geweberegeneration und bei der Homöostase. Der wesentliche Unterschied zwischen embryonalen pluripotenten Stammzellen und adulten multipotenten Stammzellen liegt in der Zahl der differenzierten Gewebe, die aus den jeweili- gen Zellen gewonnen werden können. Ursache hierfür ist vermutlich, daß pluripotente Stammzellen aus Samenzellen oder aus Zellen hervorgehen, die Samen produzieren können, während adulte multipotente Stammzellen aus dem Körper oder dem Soma adulter Individuen stammen (vergl. a. a. O., Seite 94), die zur Samenproduktion nicht in der Lage sind.

[0004] Die eigentliche Problematik bezüglich der Gewinnung und Verwendung adulter Stammzellen beruht jedoch auf dem seltenen Vorkommen dieser Zellen. So finden sich im Knochenmark Stammzellen nur im Verhältnis von 1 : 10.000, im peripheren Blut von 1 : 250.000 und in der Leber im Verhältnis von 1 : 100.000. Die Gewinnung derartiger Stammzellen ist somit sehr aufwendig und für den Patienten belastend. Darüber hinaus ist die Generierung großer Zellmengen, wie sie zur klinischen Therapie benötigt werden, mit vertretbarem Aufwand bisher kaum möglich.

[0005] Dem steht ein ständig wachsender Bedarf an Möglichkeiten zur Behandlung von zerstörtem Gewebe im Sinne des "tissue engineering" oder als zelluläre Therapie gegenüber, im Rahmen derer Haut-, Muskel-, Herzmuskel-, Leber-, Insel-, Nerven-, Neuronen-, Knochen-, Knorpel-, und Endothelzellen und Fettzellen etc. zu ersetzen sind.

[0006] Entscheidend ist in diesem Zusammenhang die für die westliche Welt vorauszusehende Entwicklung des Alters- und Krankheitsprofils der Bevölkerung, die für die nächsten 10 Jahre eine drastische Wende auf dem Gesundheits- und Versorgungssektor der westeuropäischen Bevölkerung einschl. USA und Kanada erwarten läßt. Allein für die Bundesrepublik Deutschland läßt die demografische Entwicklung bis zum Jahre 2015 einen Zuwachs der Bevölkerung in den Altersklasse von 45–64 Jahren um 21% und in der Gruppe der über 65jährigen einen Zuwachs von 26% vermuten. Hieraus wird zwangsläufig eine Wandlung der Patientenstruktur und des behandlungsbedürftigen Krankheitsspektrums resultieren. Vorhersehbarweise werden Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Hochdruck, Myocardinfarkt), Gefäßerkrankungen durch Arteriosklerose und Stoffwechselerkrankungen, metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Leberstoffwechselerkrankungen, Nierenfunktionserkrankungen sowie durch altersbedingte Degeneration verursachte Erkrankungen des Knochen- und Knorpelgerüstes und degenerative Erkrankungen des Cerebrums durch neuronale und gliale Zellverluste zunehmen und innovative Behandlungskonzepte erforderlich machen.

[0007] Vor diesem Hintergrund erklären sich die immensen nationalen und internationalen Bemühungen an Forschung und Entwicklung beteiligter Fachleute, Stammzellen in die Hand zu bekommen, die sich in ausdifferenzierte gewebety- pische Zellen (Leber, Knochen, Knorpel, Muskel, Haut etc.) programmieren lassen.

[0008] Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Stammzellen zur Verfügung zu stellen, deren Generierung keine ethischen und/oder rechtlichen Probleme verursacht, die schnell für den geplanten Therapieeinsatz in den hierfür erforderlichen Mengen und zu vertretbaren Herstellungskosten zur Verfügung stehen, und die beim Einsatz als "zelluläre Therapeutika" keine oder keine nennenswerten Nebenwirkungen im Sinne der zellulären Abstoßung und der Induktion von Tumoren, insbesondere von bösartigen Tumoren, in dem jeweiligen Patienten auslösen.

[0009] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Herstellung von dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen aus menschlichen Monozyten gelöst. Der Begriff "Dedifferenzierung" ist dem auf dem einschlägigen Gebiet tätigen Fachmann geläufig, vgl. beispielsweise Weissmann I. L., *Cell* 100, 157–168, **Abb. 4**, (2000). Es bedeutet die Rückführung einer bereits spezialisierten (differenzierten) Körperzelle in den Status einer Stammzelle, d. h. einer Zelle, welche ihrerseits in eine Vielzahl von Zelltypen überführt (programmiert) werden kann. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren zur Dedifferenzierung von Monozyten führt. Die auf diese Weise hergestellten Stammzellen lassen sich in zahlreiche verschiedene Zielzellen, bzw. Zielgewebe umwandeln (programmieren), vgl. Beispiele. Die erfindungsgemäßen Stammzellen exprimieren neben dem für ausdifferenzierte Monozyten kennzeichnenden Oberflächenantigen CD14 mindestens einen, vorzugsweise zwei oder drei, der typischen Pluripotenzmarker CD90, CD117, CD123 und CD135. In besonders bevorzugter Weise exprimieren die erfindungsgemäß hergestellten Stammzellen sowohl das Oberflächenantigen CD14 als auch die vier Pluripotenzmarker CD90, CD117, CD123 und CD135, vgl. Beispiel 2, Tabelle 1. Es werden damit erstmals adulte Stammzellen zur Verfügung gestellt, die innerhalb kurzer Zeit zu vorzugsweise autologen Geweben reprogrammierbar sind.

[0010] Die Generierung der erfindungsgemäßen Stammzellen ist für den Patienten völlig unbedenklich und – bei auto-

logischer Anwendung – mit einer Eigenblutspende vergleichbar. Die für die üblichen Therapieoptionen (s. oben) benötigte Menge an Stammzellen (10^8 bis 10^9 Zellen) kann innerhalb von 10 bis 14 Tagen nach Blutabnahme kostengünstig bereitgestellt werden. Darüber hinaus erzeugt das für die Therapie vorgesehene Zellprodukt kein immunologisches Problem im Sinne der Zellabstoßung, da vorzugsweise Zellen und Empfänger genetisch identisch sind.

[0011] Die erfindungsgemäßen Stammzellen erwiesen sich ferner im Tierversuch und in Kultur als risikolos bezüglich der Malignomentstehung, ein Ergebnis, welches aufgrund der monozytären Ursprungszelle, von der sich die erfindungsgemäßen Stammzellen ableiten, nicht anders zu erwarten ist. 5

[0012] Die wesentlichen Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von adulten Stammzellen umfassen:

(a) Isolieren von Monozyten aus Human-Blut,
(b) Vermehrern der Monozyten in einem geeigneten Kulturmedium, welches den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (nachfolgend als M-CSF bezeichnet) enthält; und
(c) Kultivieren der Monozyten in Gegenwart von Interleukin 3 (IL-3). Das Vermehrern und die Behandlung mit IL-3 können in einer Stufe durchgeführt werden, indem man dem Kulturmedium sowohl den Wachstumsfaktor als auch IL-3 zusetzt. 10 15

[0013] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Zellen ferner in Gegenwart einer Mercaptoverbindung kultiviert. Die Kultivierung kann in einer gesonderten Verfahrensstufe erfolgen, die sich an die oben beschriebene Kultivierung anschließt. Sie kann jedoch auch in der gleichen Stufe erfolgen, indem man dem Kulturmedium, vorzugsweise bereits zu Beginn der Kultivierung, ferner die Mercaptoverbindung zusetzt. 20

[0014] Im Anschluß an die Kultivierung der Zellen in Gegenwart von M-CSF, sowie in Gegenwart von IL-3 und gegebenenfalls einer Mercaptoverbindung, erfolgt vorzugsweise eine Behandlung mit einem biologisch verträglichen organischen Lösungsmittel.

[0015] Das erfindungsgemäße Verfahren führt überraschenderweise zur Dedifferenzierung der Monozyten, wobei die aus der Dedifferenzierung resultierenden Stammzellen neben dem für ausdifferenzierte Monozyten typischen Oberflächenantigen CD14 auch mindestens einen oder mehrere, vorzugsweise sämtliche der Pluripotenzmarker CD90, CD117, CD123 und CD135 exprimieren (vergl. Tabelle 1). Die Expression der jeweiligen Marker (Oberflächenantigene) kann mittels kommerziell erhältlicher Antikörper mit Spezifität gegenüber den jeweils zu ermittelnden Antigenen mit üblichen Immunnachweisverfahren nachgewiesen werden, vgl. Beispiel 2. 25 30

[0016] Da die Zellen während des Vermehrungs- und Dedifferenzierungsprozesses am Boden des jeweiligen Kulturgefäßes haften, ist es erforderlich, die Zellen nach Abschluß der Dedifferenzierung vom Untergrund zu lösen. Die Ablösung kann mechanisch erfolgen, bevorzugt ist jedoch die enzymatische Ablösung mit beispielsweise Trypsin.

[0017] Die so erhaltenen, frei im Medium flottierenden dedifferenzierten programmierbaren Stammzellen können entweder direkt dem Reprogrammierungsprozeß zugeführt werden, oder aber für einige Tage im Kulturmedium gehalten werden, wobei in letzterem Falle dem Medium vorzugsweise ein Zytokin oder LIF (leukaemia inhibitory factor) zugesetzt wird, um vorzeitigen Verlust der Programmierbarkeit zu vermeiden (vgl. Donovan und Gearhart, a. a. O., Seite 94). Schließlich können die Zellen zum Zwecke der Lagerung ohne Verlust der Programmierbarkeit tiefgefroren werden. 35

[0018] Die erfindungsgemäßen Stammzellen unterscheiden sich von den bisher bekannten pluripotenten Stammzellen embryonalen Ursprungs und von den bekannten adulten Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben dadurch, daß sie neben den multipotenten Stammzellmarkern CD90, CD117, CD123 und/oder CD135, auch den typischen Differenzierungsmarker CD14 der Monozyten auf ihrer Oberfläche tragen, aus denen sie hervorgegangen sind. 40

[0019] Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Stammzellen können zu beliebigen Körperzellen reprogrammiert werden. Verfahren zum Reprogrammieren von Stammzellen sind im Stand der Technik bekannt, vergl. beispielsweise Irving L. Weissman, Science 287, 1442–1446 (2000) und Insight Review Articles "Nature" 414, 92–131, (2001), sowie das Handbuch "Methods of Tissue Engineering", Herausg. Anthony Atala und Robert P. Lanza, Academic Press, ISBN: 0-12-436636-8; Library of Congress Catalog Card No. 200188747. 45

[0020] Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Stammzellen einfach und zuverlässig in gewünschte Zielzellen, wie beispielsweise Adipozyten (vgl. Beispiel 6), Hepatozyten (vgl. Beispiel 7) und Keratinozyten (vgl. Beispiel 8) differenziert werden, in dem man die Stammzellen in einem Medium wachsen läßt, welches den Überstand des Kulturmediums enthält, in dem die jeweiligen Zielzellen und/oder Fragmente derselben inkubiert wurden. Dieser Überstand wird nachfolgend als "Zielzell-konditioniertes Medium" bezeichnet.

[0021] Zum Differenzieren (Reprogrammieren) der erfindungsgemäßen Stammzellen, kann demgemäß so vorgegangen werden, daß man

a) Gewebe zerkleinert, welches die gewünschten Zielzellen enthält oder aus diesen besteht;
b) die Gewebezellen (Zielzellen) und/oder Fragmente derselben gewinnt;
c) die Zielzellen und/oder Fragmente derselben in einem geeigneten Kulturmedium inkubiert;
d) den Überstand des Kulturmediums während und nach der Inkubation als Zielzell-konditioniertes Medium sammelt; und
e) zum Reprogrammieren/Differenzieren von Stammzellen in die gewünschten Zielzellen oder Zielgewebe die Stammzellen in Gegenwart des Zielzell-konditionierten Mediums wachsen läßt. 55 60

[0022] Als Kulturmedium können übliche Zellkultur-Medien verwendet werden (vergleiche Beispiele). Vorzugsweise enthalten die Medien Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise den epidermalen Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor). 65

[0023] Die Inkubation der Zielzellen und/oder Fragmente derselben ("Zellpellet") kann 5 bis 15, vorzugsweise 10 Tage lang erfolgen. Vorzugsweise wird der Überstand, d. h. das Zielzell-konditionierte Medium jeweils nach 2 bis 4 Tagen ab-

genommen und durch frisches Medium ersetzt. Die so gewonnenen Überstände können getrennt oder vereinigt steril filtriert und bei etwa -20°C gelagert oder direkt zum Programmieren von Stammzellen eingesetzt werden. Wie oben dargelegt, erfolgt die Programmierung der Stammzellen in die gewünschten Zielzellen dadurch, daß man Stammzellen in Gegenwart des mit den jeweiligen Zielzellen konditionierten Mediums wachsen läßt (vgl. Beispiele). Vorzugsweise enthält das Wachstumsmedium zusätzlich einen Zielzell-spezifischen Wachstumsfaktor, wie beispielsweise den "Hepatocyte Growth Factor" oder den "Keratinocyte Growth Factor" (vgl. Beispiele).

[0024] Die erfindungsgemäßen dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen sind per se als pharmazeutisches Präparat einsetzbar. Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich *in vivo* durch den direkten Kontakt mit dem Zellverband eines bestimmten Zelltyps spontan in Zellen dieses Typs zu differenzieren. Verfahren zur Gewebeherstellung unter Einsatz von re- oder um-differenzierbaren Zellen ("tissue engineering") sind im Stand der Technik bekannt. Beispielsweise wurde von Wang, X. et al., "Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells" in Ann. J. Pathol. 158 (2), 571-579 (2001) gezeigt, daß sogar bestimmte adulte Zellen der Bauchspeicheldrüse der Maus in der Lage sind, sich in FAH defizienten Mäusen zu Hepatozyten umzuwandeln, die den metabolischen Stoffwechseldefekt in diesen Tieren voll kompensieren können. Ein weiteres Beispiel sind die Untersuchungen von Lagasse et al., "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*", Nature Medicine, 6(11), 1229-1234 (2000). Die Autoren haben gezeigt, daß hämatopoietische Stammzellen aus dem Knochenmark in der Lage waren, sich nach *in vivo* Transfer in FAH-defiziente Mäuse in Hepatozyten umzuwandeln, die dann den metabolischen Defekt kompensieren konnten; siehe auch den Übersichtsartikel von M. Grompe, "Therapeutic Liver Repopulation for the Treatment of Metabolic Liver Diseases" in Hum. Cell, 12: 171-180 (1999).

[0025] Bevorzugte Applikationsformen für die erfindungsgemäßen Stammzellen sind Injektion, Infusion oder Implantation. Für die Injektion oder die Infusion können die Zellen in PBS (phosphate buffered saline) verabreicht werden.

[0026] Bevorzugte Beispiele für in diesem Zusammenhang relevante Indikationen sind: Leberzirrhose, Pankreasinsuffizienz, akutes oder chronisches Nierenversagen, hormonelle Unterfunktionen, Herzinfarkt, Lungenembolie, Schlaganfall und Hautschäden.

[0027] Für die therapeutische Verwendung der aus den erfindungsgemäßen Stammzellen erhältlichen Zielzellen stehen zahlreiche Konzepte zur Verfügung [siehe oben Science 287, 1442-1446 (2000) und "Nature" 414, 92-131, (2001)].

[0028] So können die Zellen direkt in die zu rekonstituierenden Organe eingebracht werden. Das Einbringen kann über Matrixkonstruktionen erfolgen, die mit entsprechend differenzierten oder differenzierungsfähigen Zellen beschichtet werden. Die Matrixkonstruktionen sind in der Regel bioabbaubar, so daß sie während des Verwachsens der neu eingebrachten Zellen mit den vorhandenen Zellen aus dem Körper verschwinden. In Betracht kommen unter diesem Gesichtspunkt beispielsweise zelluläre, vorzugsweise autologe Transplantate in Form von Inselzellen, Hepatozyten, Fettzellen, Hautzellen, Muskeln, Herzmuskeln, Nerven, Knochen, endokrinen Zellen etc. zur Restitution beispielsweise nach partieller chirurgischer Resektion eines Organes, zur Reparatur beispielsweise nach einem Trauma oder zur unterstützenden Anwendung, beispielsweise bei fehlender oder zu geringer Organfunktion.

[0029] Die erfindungsgemäßen Stammzellen und die aus ihnen hervorgegangenen Zielzellen können ferner zur Beschichtung von Prothesen wie Herzklappen, Gefäßprothesen, Knochen- und Gelenkprothesen etc. dienen, um die Biokompatibilität zu erhöhen.

[0030] Die Zellen können auch in künstlichen Konstrukten, wie beispielsweise in Beuteln oder Kammern in den Körper eingebracht werden, um beispielsweise künstliche Inselzellportkammern zur Versorgung mit Insulin zu schaffen.

[0031] Entsprechend können beispielsweise Adipozyten-gefüllte Polymere zum Brustaufbau nach Operationen und für alle weiteren Indikationen der plastischen und/oder kosmetischen Korrektur zum Einsatz kommen. Weiter können semipermeable Portkamersysteme, bestückt mit endokrinen Zellen verschiedenster Provenienz, *in vivo* zur Behandlung endokriner, metabolischer oder hämostatischer Erkrankungen zum Einsatz kommen. Beispiele für derartige endokrine Zellen sind Thyroxin, Steroide, ADH, Aldosteron, Melatonin, Serotonin, Adrenalin, Noradrenalin, TSH, LH, FSH, Leptin, Cholezystokinin, Gastrin, Insulin, Glucagon, oder Gerinnungsfaktoren produzierende Zellen.

[0032] Die aus den erfindungsgemäßen Stammzellen hervorgegangenen Zielzellen können darüber hinaus als Zellkulturen außerhalb des Körpers in Bioreaktoren eingesetzt werden, um beispielsweise Entgiftungsreaktionen durchzuführen. Diese Verwendungsförm ist insbesondere bei akuten Zuständen relevant, beispielsweise bei akutem Leberversagen als Hepatozyten-Bioreaktor oder als Peritonealzellen enthaltendes Dialysat zur Anwendung bei der Peritonaldialyse niereninsuffizienter Patienten.

[0033] Schließlich wird durch die erfindungsgemäßen pluripotenten Stammzellen ein weites Feld für die transgene Modifikation und Therapie eröffnet. So können die dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen gemäß der Erfindung per se oder die von ihnen abgeleiteten Zielzellen mit spezifischen Genkonstrukten transfiziert werden. Auf diese Weise können Gene, die für die Aufrechterhaltung metabolischer Leistungen in bestimmten Organen, wie beispielsweise Leber oder Niere, erforderlich sind, wiederhergestellt bzw. unterstützt oder neu eingebracht werden. Beispielsweise können Stammzellen oder von diesen abgeleitete Hepatozyten mit dem. FAH-(Fumaryl-Acetoacetat-Hydrolase) Gen transfiziert werden. Im FAH-defizienten Mausmodell genügte die intrasplenische Injektion von 1000 FAH-positiven Spenderhepatozyten, um nach 6 bis 8 Wochen die Leber komplett zu repopulärizieren und den zur Leberzirrhose führenden metabolischen Defekt voll zu kompensieren (vgl. Grompe M. et al. Nat. Genet. 12, 266 ff, 1996).

[0034] Entsprechend kann durch Transfektion der Stammzellen bzw. der jeweiligen aus den Stammzellen durch Programmierung hervorgegangenen Zielzellen (beispielsweise hämatopoietische Zellen, Hepatozyten, Ovarzellen, Muskelzellen, Nervenzellen, Neurone, Gliazellen, Korpel- oder Knochenzellen, etc.) mit "Multi-Drug-Resistance-Genen" die

erweiterte radikale Chemotheerapie bei malignen Erkrankungen durch entsprechende hämatopoietische Rekonstitution ermöglicht werden oder Strahlenresistenz erzeugt werden.

[0035] Die Erfindung wird nachfolgend im einzelnen erläutert:

Ausgangsmaterial für das erfundungsgemäße Verfahren sind Monozyten aus humanem Blut. Vorzugsweise handelt es sich um Monozyten, die aus dem Blut desjenigen Patienten stammen, welcher mit den erfundungsgemäßen Stammzellen oder den aus diesen hergestellten Zielzellen therapiert werden soll.

[0036] Zur Gewinnung der Monozyten kann das Blut zunächst nach üblicher Behandlung mit einem Antikogakulanz auf bekannte Weise, vorzugsweise durch Zentrifugation, in Plasma sowie in weiße und rote Blutzellen getrennt werden. Nach der Zentrifugation findet sich das Plasma im Überstand; darunter liegt eine Schicht, welche die Gesamtheit der weißen Blutzellen enthält. Diese Schicht wird auch als "Buffy coat" bezeichnet. Darunter befindet sich die rote Blutzellen enthaltende Phase (Haematokrit).

[0037] Anschließend wird die "Buffy coat" Schicht isoliert und zur Gewinnung der Monozyten beispielsweise durch Zentrifugieren nach bekannten Verfahren aufgetrennt. Gemäß einer bevorzugten Verfahrensvariante wird die "Buffy coat" Schicht auf ein Lymphozytentrennungsmedium (Ficoll Hypaque) geschichtet und zentrifugiert (vergl. Beispiel 1). Durch weiteres Zentrifugieren und Spülen wird die Fraktion der Monozyten aus dem Blut gewonnen (vergl. Beispiel 1).

[0038] Beispiele für alternative Verfahren zur Gewinnung der Monozyten aus dem Vollblut sind das "Fluorescent-Activating Cell Sorting" (FACS), das "Immunomagnetic Bead Sorting" und "Magnetic Activated Cell Sorting" (MACS) oder das sogenannte "Rosetting Verfahren", vgl. Gmelig-Meyling F. et al., "Simplified procedure for the separation of human T and non-T cells", Vox Sang. 33, 5-8 (1977).

[0039] Für die Herstellung einer ausreichenden Menge an Stammzellen ist es zunächst erforderlich, die Monozyten zu vermehren. Zu diesem Zweck können bekannte, für Monozyten geeignete Wachstumsmedien verwendet werden, wobei das Medium erfundungsgemäß M-CSF (macrophage-colony-stimulating-factor) enthält. M-CSF (auch als CSF-1 bezeichnet) wird von Monozyten, Fibroblasten und endothelialen Zellen produziert. Die Konzentration von M-CSF in dem Kulturmedium kann von 2 bis 20 µg/l Medium, vorzugsweise 4 bis 6 µg/l und in besonders bevorzugter Weise 5 µg/l betragen.

[0040] Anschließend oder gleichzeitig müssen die Zellen in Gegenwart von Interleukin 3 (IL-3) kultiviert werden. Die Konzentration von IL-3 in dem Medium kann von 0,2 bis 1 µg, vorzugsweise 0,3 bis 0,5 µg und in besonders bevorzugter Weise 0,4 µg IL-3/l betragen.

[0041] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Zellen zusätzlich in Gegenwart einer Mercaptoverbindung kultiviert, in der mindestens eine Kohlenwasserstoffgruppe an den Schwefel gebunden ist, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe(n) mit einer oder mehreren funktionellen Gruppen substituiert sein kann (können). Durch die zusätzliche Verwendung einer derartigen Schwefelverbindung kann die Anzahl der durch Dedifferenzierung der monozytären Ursprungszellen gewonnenen Stammzellen gesteigert werden, die einen oder mehrere der Stammzellmarker CD90, CD117, CD123 und CD135 exprimieren.

[0042] Vorzugsweise ist/sind die funktionelle(n) Gruppe(n) Hydroxyl- und/oder Amingruppen. In besonders bevorzugter Weise ist die Schwefelverbindung 2-Mercaptoethanol. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Schwefelverbindung Dimethylsulfoxid (DMSO).

[0043] Die Menge der verwendeten Schwefelverbindung kann von etwa 4 bis etwa 200 µMol/l bezogen auf den Schwefel betragen. Bevorzugt sind etwa 100 µMol/l.

[0044] Bei Verwendung von 2-Mercaptoethanol sollte das Kulturmedium etwa 3 µl bis etwa 13 µl, vorzugsweise etwa 7 µl 2-Mercaptoethanol/l enthalten.

[0045] Die Behandlung mit IL-3 und gegebenenfalls mit der Schwefelverbindung kann gleichzeitig mit oder im Anschluß an die Vermehrung der Monozyten erfolgen. Vermehrung und Dedifferenzierung sollten zusammengekommen nicht mehr als 10 Tage in Anspruch nehmen, wobei die Behandlung mit IL-3 und gegebenenfalls mit der Schwefelverbindung mindestens 3 und maximal 10 Tage, vorzugsweise 6 Tage lang durchgeführt werden sollte.

[0046] Für die gemeinsame Durchführung der Vermehrung und Dedifferenzierung, wie in Beispiel 2 beschrieben, werden die Monozyten nach Isolierung in ein Medium überführt, welches sowohl den Wachstumsfaktor, insbesondere M-CSF, als auch das IL-3 sowie vorzugsweise die Schwefelverbindung, insbesondere Mercaptoethanol oder DMSO enthält.

[0047] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung schließt sich im nächsten Schritt die Zugabe eines biologisch verträglichen organischen Lösungsmittels zu dem die Zellen enthaltenden Medium an, um die Zahl der am Ende des Verfahrens frei im Medium flottierenden Stammzellen zu erhöhen. Die Menge des Lösungsmittels kann 10 µl bis 1 ml betragen. Vorzugsweise handelt es sich um einen Alkohol mit 1-4 Kohlenstoffatomen, wobei die Zugabe von Ethanol besonders bevorzugt ist. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Zellen mit der Dampfphase des zuvor definierten biologisch verträglichen organischen Lösungsmittels, vorzugsweise mit Ethanol-dampf, in Kontakt gebracht (vgl. Beispiel 2). Die Einwirkungszeit des organischen Lösungsmittels, in besonders bevorzugter Weise des Ethanol-dampfes, sollte 4-12 Stunden, vorzugsweise 8-10 Stunden betragen.

[0048] Vorzugsweise wird das erfundungsgemäße Verfahren in Kulturgefäßen durchgeführt, deren Oberfläche zuvor mit foetalem Kälberserum (FCS) beschichtet wurde (vergl. Beispiel 2). Alternativ kann auch humanes AB-Serum männlicher Spender verwendet werden. Die Beschichtung mit FCS kann dadurch erfolgen, daß man die Oberfläche der Kulturgefäße vor Ingebrauchnahme mit FCS bedeckt, und nach einer Einwirkungszeit von einigen Stunden, insbesondere 2 bis 12 Stunden, und in besonders bevorzugter Weise 7 Stunden, das nicht an der Oberfläche haftende FCS auf geeignete Weise entfernt.

[0049] Aufgrund ihrer adhäsiven Eigenschaften haften die Monozyten und die während des Verfahrensablaufs aus diesen hervorgehenden Stammzellen am Boden des jeweiligen Kulturgefäßes.

[0050] Wird eine Behandlung mit organischem Lösungsmittel durchgeführt, so lösen die Zellen sich bereits in dieser Verfahrensstufe in gewissem Umfang vom Boden. Die (weitere) Ablösung kann auf mechanische Weise, beispielsweise mit einem feinen Zellschaber, Spachtel oder einer Pipettenspitze erfolgen.

[0051] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die vollständige Ablösung durch Behand-

lung mit einem geeigneten Enzym, beispielsweise mit Trypsin (vergl. Beispiel 2). Die Trypsin-Lösung (0,1 bis 0,025 g/l, vorzugsweise 0,05 g/l) kann 2–10 Min. lang bei 35°C bis 39°C, vorzugsweise bei 37°C in Gegenwart von CO₂ auf die Zellen einwirken.

5 [0052] Die Trypsinaktivität wird sodann auf übliche Weise blockiert und die nun frei flottierenden dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen können auf übliche Weise beispielsweise durch Zentrifugieren gewonnen werden. Sie stehen nunmehr, entweder suspendiert in einem geeigneten Medium, beispielsweise in RPMI-1640, für die sofortige Differenzierung in die gewünschten Zielzellen zur Verfügung. Sie können jedoch auch einige Tage lang in dem Medium gehalten werden, wobei dann, wenn die Zellen länger als etwa 48 Stunden als dedifferenzierte, programmierbare Stammzellen in Kultur gehalten werden sollen, das Hinzufügen von Zytokinen oder LIF-Faktor (Leukemia inhibitory factor), vergl. Nature, 414, 94, (2001 – a. a. O.) bevorzugt ist. In einem derartige Faktoren enthaltenden Medium können die Stammzellen mindestens 10 Tage lang als dedifferenzierte, programmierbare Stammzellen gehalten werden.

10 [0053] Für die längere Lagerung können die Zellen tiefgefroren werden. Protokolle zum Tiefgefrieren lebender Zellen sind im Stand der Technik bekannt, vgl. Griffith M. et al., Epithelial Cell Culture, Cornea, in Methods of Tissue Engineering, Atala A. und Lanza RP, Academic Press 2002, Kap. 4, Seiten 131 bis 140. Ein bevorzugtes Suspensionsmedium 15 zum Tiefgefrieren der erfundungsgemäßen Stammzellen ist FCS enthaltendes DMEM, vergl. Beispiel 2.

[0054] Die Erfundung wird nachfolgend anhand von Beispielen weiter erläutert und beschrieben.

15 [0055] Soweit nicht innerhalb der Beispiele definiert, ist die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Substanzen, nachfolgend angegeben:

20 1. Penicillin/Streptomycin-Lösung

10.000 Einheiten Penicillin als Natriumsalz von Penicillin G und 1000 µg Streptomycin als Streptomycinsulfat je ml physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%).

25 2. Trypsin-EDTA

0,5 g Trypsin und 0,2 g EDTA (4 Na)/l

30 3. Insulin

human, rekombinant hergestellt in E. coli, etwa 28 Einheiten/mg

35 4. RPMI 1640 (1X, flüssig (11875) Enthält L-Glutamin

35 [0056] RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Media 1640 sind angereicherte Formulierungen, mit weitreichender Anwendbarkeit für Säugerzellen.

40

45

50

55

60

65

Komponenten	Mol.-Gewicht	Konz. (mg/l)	Molarität (nM)
Anorganische Salze			
Calciumnitrat (Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O)	236	100,00	0,424
Kaliumchlorid (KCl)	75	400,00	5,30
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	120	48,84	0,407
Natriumchlorid (NaCl)	58	6000,00	103,44
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	84	2000,00	23,800
Natriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	142	800,00	5,63
Weitere Komponenten			
Glucose	180	2000,00	11,10
Glutathion, reduziert	307	1,50	0,0032
Phenolrot	398	5,00	0,0125
Aminosäuren			
L-Arginin	174	200,00	1,10
L-Asparagin	132	50,00	0,379
L-Asparaginsäure	133	20,00	0,150
L-Cysteindihydrochlorid	313	65,00	0,206
L-Glutaminsäure	147	20,00	0,136
L-Glutamin	146	300,00	2,05
Glycin	75	10,00	0,133
L-Histidin	155	15,00	0,0967
L-Hydroxyprolin	131	20,00	0,153
L-Isoleucin	131	50,00	0,382
L-Leucin	131	50,00	0,382
L-Lysinhydrochlorid	146	40,00	0,219
L-Methionin	149	15,00	0,101
L-Phenylalanin	165	15,00	0,0909
L-Prolin	115	20,00	0,174
L-Serin	105	30,00	0,286
L-Threonin	119	20,00	0,168
L-Tryptophan	204	5,00	0,0245
L-Tyrosindinatrium, Dihydrat	261	29,00	0,110
L-Valin	117	20,00	0,171
Vitamine			
Biotin	244	0,20	0,008
D-Calciumpantothenat	477	0,25	0,0005
Cholinchlorid	140	3,00	0,0214
Folsäure	441	1,00	0,0022
i-Inositol	180	35,00	0,194
Naicinamid	122	1,00	0,0081
p-Amonobenzoësäure (PABA)	137	1,00	0,0072
Pyridoxin HCl	206	1,00	0,0048
Riboflavin	376	0,20	0,0005
Thiamin HCl	337	1,00	0,0029
Vitamin B12	1355	0,005	0,00000369

Referenz: Moore G.E., Gerner, R.E. und Franklin, H.A. (1967) J.A.M.A., 199:519

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Komponenten	g/l
KCl	0,2
KH ₂ PO ₄	0,2
NaCl	8.00
Na ₂ PHO ₄	1,15

15 6. 2-Mercapto-Ethanol

Qualität zur Synthese; Gehalt > 98%, Dichte 1,115 bis 1,116, vergl. z. B. Momo, Jet al., J. Am. Chem. Soc. 73, 4961 (1951).

20 7. Ficoll-Hypaque

Lymphozyten Separationsmedium (Saccharose/Epichlorhydrin Copolymerisat Mg 400.000, -; Dichte 1,077, eingestellt mit Natriumdiatrizoat).

25 8. Retinsäure

Vitamin A Säure (C₂₀H₂₈O₂), 300 µl in 1.5 ml PBS entsprechend 1 mM. Als Medium zum Programmieren von Neuronen und Gliazellen 150 µl auf 10 ml Medium entsprechend 10⁻⁶ M verwenden.

30 9. DMEM

(Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (high glucose) vgl. Dulbecco, R. et al., Virology 8, 396 (1959) Smith, J. D. et al., Virology 12, 158 (1960) Tissue Culture Standards Committee, In Vitro 6, 2 (1993)

35 10. L-Glutamin

flüssig: 29,2 mg/ml

40 11. Collagenase Typ II

Vergl. Robbell, M. et al., J. Biol. Chem. 239, 375 (1964).

45 12. Interleukin-3 (IL-3)

45 Rekombinantes humanes IL-3 aus E. coli [(Yang Y. C. et al., Cell 47, 10 (1986)]; enthält das 133 Aminosäure-Reste umfassende reife IL-3 und die 134 Aminosäure-Reste umfassende Methionyl-Form im Verhältnis von etwa 1 : 2; berechnete Mol-Masse etwa 17.5 kD; (R&D Katalog Nr. 203-IL)

50 13. Antikörper

50 Die in den Beispielen verwendeten Antikörper gegen die Antigene CD14, CD31, CD90, CD117, CD123, CD135 sind kommerziell erhältlich. Sie wurden aus den folgenden Quellen bezogen:
 CD14: DAKO, Monoclonal Mouse Anti-Human CD14, Monocyte, Clone TÜK4, Code No. M 0825, Lot 036 Edition 02.02.01;
 55 CD31: PharMingen International, Monoclonal Mouse Anti-Rat CD31 (PECAM-1), Clone TLD-3A12, Katalog No. 22711D, 0,5 mg;
 CD90: Biozol Diagnostica, Serotec, Mouse Anti Human CDw90, Clone No. F15-42-1, MCAP90, Batch No. 0699;
 CD117: DAKO, Monoclonal Mouse Anti-Human CD117, c-kit, Clone No. 104D2, Code No. M 7140, Lot 016, Edition 04.05.00;
 60 CD123: Research Diagnostics Inc., Mouse anti-human CD123 antibodies, Clone 9F5, Katalog No. RDI-CD123-9F5;
 CD135: Serotec, Mouse Anti Human CD135, MCA1843, Clone No. BV10A4H2.

Beispiel 1

65 Abtrennen von Monozyten aus Gesamtblut

[0057] Zur Vermeidung der Blutgerinnung und zum Füttern der Zellen wurden 450 ml Vollblut in einem 3-Kammerbeutel-Set mit 63 ml einer Stabilisator-Lösung vermischt, die je Liter H₂O 3,27 g Citronensäure, 26,3 g Trinatriumcitrat,

25,5 g Dextrose, und 22,22 g Natriumdihydroxyphosphat enthielt. Der PH-Wert der Lösung betrug 5,6–5,8.

[0058] Zur Blutkomponententrennung erfolgte anschließend eine "scharfe Zentrifugation" dieses Gemisches zur Blutkomponententrennung, bei 4000 rpm über 7 min bei 20°C. Hieraus resultierte eine 3-Schichtung der korpuskulären und nicht-korpuskulären Bestandteile. Durch Einsetzen des Beutelsets in eine dafür vorgesehene Preßmaschine wurden dann die Erythrozyten in den unteren Beutel, das Plasma in den oberen Beutel gepreßt und der sogenannte Buffy-coat verblieb im mittleren Beutel und enthielt ca. 50 ml Volumen. 5

[0059] Die Menge von 50 ml frisch gewonnenem Buffy-coat wurde nun in jeweils 2 Portionen á 25 ml geteilt und damit jeweils 25 ml Ficoll-Hypaque Separationsmedium überschichtet, welches zuvor in zwei 50 ml Falconrörchen gefüllt worden war.

[0060] Dieser Ansatz wurde 30 Min. lang bei 2500 rpm ungebremst zentrifugiert. Im Buffy coat noch vorhandene Erythrozyten und tote Zellen lagen danach unterhalb der Ficoll-Phase während die weißen Blutzellen einschließlich der Monozyten als weiße Interphase auf dem Ficoll separiert sind. 10

[0061] Anschließend wurde die weiße Interphase der Monozyten vorsichtig abpipettiert und mit 10 ml Phosphat gepuffter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gemischt.

[0062] Danach wurde dieser Ansatz dreimal 10 Min. lang bei 1800 rpm gebremst zentrifugiert, wobei der Überstand nach jeder Zentrifugation abpipettiert und mit frischem PBS aufgefüllt wurde. 15

[0063] Das am Boden des Zentrifugationsgefäßes (Falconrörchen) gesammelte Zellpellet enthielt die mononukleäre Zellfraktion, d. h. die Monozyten.

Beispiel 2

20

Vermehrung und Dedifferenzierung der Monozyten

[0064] Die Kultivierung und Vermehrung der Monozyten einerseits und die Dedifferenzierung der Zellen andererseits erfolgte in einem Schritt in Nährmedium der folgenden Zusammensetzung: 25

RPMI 1640 Medium	440 ml
Foetales Kälberserum (FCS)	50 ml
Penicillin/Streptomycin Lösung	5 ml
2-Mercaptoethanol (Stocklösung)	5 ml
Gesamtvolumen	500 ml

30

35

40

45

50

55

60

[0065] Das Nährmedium enthielt ferner 2,5 µg/500 ml M-CSF und 0,2 µg/500 ml Interleukin 3 (IL-3).

[0066] Die in Beispiel 1 isolierten Monozyten wurden in 5 Kammern einer 6-Kammer-Rundlochplatte (30 mm Durchmesser pro Loch) in einer Menge von jeweils etwa 10^5 Zellen je Kammer übertragen und mit jeweils 2 ml des oben angegebenen Nährmediums aufgefüllt. Die 6 Loch-Platte war zuvor mit reinem inaktivierten FCS gefüllt und das FCS nach etwa 7 Stunden abgegossen worden, um auf diese Weise eine FCS beschichtete Platte zu erhalten. Die Bestimmung der Zellzahl für die exakte Dosierung je Loch erfolgte nach bekannten Verfahren, vergl. Hay R. J., Cell Quantification and Characterisation, in Methods of Tissue Engineering, Academic Press 2002, Kapitel 4, S. 55–84. 40

[0067] Die 6-Loch-Platte wurde mit dem zugehörigen Deckel abgedeckt und 6 Tage lang in einem Brutschrank bei 37°C gehalten. Die Zellen setzten sich nach 24 Stunden am Boden der Kammern ab. An jedem zweiten Tag wurde der Überstand abpipettiert und die Kammern der 6-Loch-Platte mit jeweils 2 ml frischem Nährmedium wieder aufgefüllt.

[0068] Am 6. Tag wurden 2 ml 70%iges Ethanol in die frei gebliebene 6. Kammer der 6-Loch-Platte gefüllt, die Platte wurde wiederum verschlossen und weitere 10 Stunden lang bei 37°C im Brutschrank gehalten. 45

[0069] Nachfolgend wurden jeweils 1 ml einer 1 : 10 mit PBS verdünnten Trypsinlösung in jede der Zellen enthaltenen Kammern der Rundlochplatte pipettiert. Die geschlossene Rundlochplatte wurde 5 Min. lang bei 37°C unter 5% CO₂ im Brutschrank gehalten.

[0070] Die Trypsinaktivität wurde danach durch Zugabe von jeweils 2 ml RPMI 1640 Medium zu den Rundlöchern geblockt. Der gesamte Überstand der jeweiligen Kammern (1 ml Trypsin + 2 ml Medium) wurde abpipettiert, in einem 15 ml Falconrörchen vereinigt und 10 Min. lang bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend verworfen und der Niederschlag mit frischem RPMI 1640 Medium (2 ml/10⁵ Zellen) versetzt.

[0071] Diese Zellsuspension konnte direkt zur Differenzierung in verschiedene Zielzellen verwendet werden.

[0072] Alternativ wurden die Zellen nach Zentrifugation und Verwerfen des Trypsin enthaltenden Überstandes mit DMSO/FCS als Einfriermedium versetzt und in einer Konzentration von 10⁶/ml tiefgefroren.

[0073] Das Einfriermedium enthielt 95% FCS und 5% DMSO. Jeweils etwa 10⁶ Zellen wurden in 1 ml des Mediums aufgenommen und in folgenden Stufen abgekühlt:

30 Min. auf Eis;

2 Stunden bei -20°C im vorgekühlten Styroporkasten;

24 Stunden bei -80°C in Styropor;

Lagerung in Röhrchen in Flüssigstickstoff (N₂) bei -180°C.

[0074] Zur immunhistochemischen Phenotypisierung der nach obigem Verfahren generierten Zellpopulation dediffe-

renzierter programmierbarer Stammzellen monozytären Ursprungs wurden jeweils 10^5 Zellen abgenommen und als Cytoxin-Präparat auf Objekträgern zur weiteren histochemischen Anfärbung fixiert. (Ref. Watson, P. A slide centrifuge; an apparatus for concentrating cells in suspension on a microscope slide. J Lab Clin Med. 68: 494-501. 1966). Hiernach konnten die Zellen durch die von Cordell JL, et al., (Literatur s. u.) beschriebene Technik mit APAAP-Rot-Komplex gefärbt werden. Die Verdünnung des zugesetzten Primärantikörpers erfolgte, soweit nicht anderes angegeben, in der Verdünnung 1 : 100 mit PBS, wobei jeweils 200 µl dieser Antikörperkonzentration eingesetzt wurde. Als Primärantikörper wurden monoklonale Antikörper gegen die in Tabelle 1 gelisteten Zellantigenepitope eingesetzt. Abb. 6 zeigt gefärbte Cytoxinpräparate und den entsprechenden Nachweis der Stammzellmarker CD90, CD117, CD123 und CD135.

10

Literatur zur Färbetechnik

Cordell J. L. et al., Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J. Histochem. Cytochem. 32, 219-229 (1984)

15

Literatur zu den Markern

CD14

Ferrero E., Goyert S. M.; "Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14";

20 Nucleic Acids Res. 16: 4173-4173 (1988).

CD31

Newman P. J., Berndt M. C., Gorski J., White J. C. II, Lyman S., Paddock C., Muller W. A.; "PECAM-1(CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily"; Science 247; 1219-1222 (1990).

25 CD90

Seki T., Spurr N., Obata F., Goyert S., Goodfellow P., Silver J.; "The human thy-1 gene: structure and chromosomal location"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6657-6661 (1985).

CD117

Yarden Y., Kuang W.-J., Yang-Feng T., Coussens L., Munemitsu S., Dull T. J., Chen E., Schlessinger J., Francke U., Ullrich A.;

30 "Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand."; EMBO J. 6: 3341-3351 (1987).

CD123

Kitamura T., Sato N., Arai K., Miyajima A.;

35 "Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors."; Cell 66: 165-1174 (1991).

CD135

Small D., Levenstein M., Kim E., Carow C., Ann S., Rockwell P., Witte L., Burrow C., Ratajazak M. Z., Gewirtz A. M., Civin C. I.;

40 "STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells.;" Proc. Natl. Acad. Sci USA, 91: 459-463 (1994).

Tabelle 1

45

Antigenexpression der erfundungsgemäßen Stammzellen

Antigen	Farbreaktion
Stammzell Marker	
CD90	++
CD117	+
CD123	++
CD135	+
Differenzierungsmarker	
CD14 (Monozyten)	+

65 [0075] Die angegebene Graduierung entspricht der ermittelten Antigenpositivität, die sich ab Tag 4 bis Tag 9 nach Kultivierung der Monozyten in den entsprechend spezifizierten Medien zeigt und erfolgte durch mikroskopischen Vergleich der jeweiligen Cytoxin-Färbungen mit der negativen Kontrolle (beobachtete Färbung ohne Primärantikörper).

+ deutliche Farbreaktion der Zellen mit dem Primärantikörper;

++ starke Farbreaktion der Zellen mit dem Primärantikörper.

[0076] Es wurden nur Cytospinpräparate evaluiert, die mehr als 70% vitale Zellen mit typischer Stammzellmorphologie (s. Abb. 6) aufwiesen.

Beispiel 3

5

Herstellung von Neuronen und Gliazellen aus adulten Stammzellen

[0077] Die Herstellung von Neuronen und Gliazellen erfolgte in Petrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm. Zur Vorbereitung der Petrischalen wurden in jede Schale 5 ml reines inaktiviertes foetales Kälberserum (FCS) gefüllt, so daß der Boden bedeckt war. Nach 7 Std. wurde der nicht an dem Boden der Petrischale haftende Anteil des FCS abpipettiert. Etwa 10^6 der gemäß Beispiel 2 hergestellten Zellen wurden in eine der vorbereiteten Petrischalen gegeben und es wurden 10 ml Nährmedium der folgenden Zusammensetzung hinzugefügt:

DMEM - Lösung	440 ml
(FCS)	50 ml
l-Glutamin	5 ml
Penicillin (100 U/l) / Streptomycin (100 μ g/l) Lösung	5 ml
Gesamtvolumen	500 ml

15

20

25

[0078] Das Nährmedium enthielt ferner Retinsäure in einer Menge von 1×100^{-6} M/500 ml.

[0079] Die Reprogrammierung/Differenzierung der eingesetzten Stammzellen in Neurone und Gliazellen erfolgte innerhalb von 10 Tagen, wobei das Medium im Abstand von etwa 3 Tagen gewechselt wurde. Die Zellen waren nach diesem Zeitraum zum größten Teil adhärent am Boden der Kämmer und konnten analog, wie zuvor für die Stammzellen beschrieben, durch kurzzeitige Trypsinierung vom Plattenboden gelöst werden.

30

Beispiel 4

35

Nachweis von neuronalen Vorläuferzellen, Neuronen und Gliazellen

[0080] Zur späteren immunhistochemischen Charakterisierung der durch die dedifferenzierten programmierbaren Stammzellen induzierten Zielzellen wurden die aus Monozyten generierten Stammzellen (10^5 Zellen/Deckelglas) auf Deckelgläschchen (20 mm \times 20 mm), die auf den Boden der 6-Rund-Lochplatten (30 mm Durchmesser pro Kammer) platziert wurden, aufgetragen und mit dem Nährmedium (2 ml) pro Lochplatte kultiviert. Nach Ausdifferenzierung der jeweiligen Zielzellen wurden diese wie folgt fixiert: Nach Abnahme des Nährmediums (Überstand) erfolgte die Fixierung der gezüchteten Zielzellen durch Zugabe von 2 ml Methanol, welches 10 Minuten lang einwirkte. Danach erfolgte das Abpipettieren des Ethanols und die Lochplatten wurden zweimalig mit PBS (jeweils 2 ml) gewaschen. Hiernach konnten die Zellen durch die von Cordell, J. L. et al. Immunoenzymatic labeling monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J. Histochem. Cytochem. 32, 219-229 (1994) beschriebene Technik mit APAAP-Rot-Komplex gefärbt werden. Die Verdünnung des zugesetzten Primärantikörpers erfolgte, soweit nicht anderes spezifiziert, in der Verdünnung 1 : 100 mit PBS, wobei jeweils 200 μ l dieser Antikörperkonzentration in jedes der 6 Rundlöcher pipettiert wurde.

40

45

50

[0081] Neuronale Vorläuferzellen wurden durch Färbung der Zellen mit dem Antikörper gegen das S100 Antigen nachgewiesen, vgl. mittleres Bild der Abb. 1 (x200).

55

[0082] Neurone wurden durch spezifische Expression von Synaptophysin MAP2 (microtubular associates protein 2) oder Neurofilament 68 mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern (Primärantikörper 1 : 300 mit PBS verdünnt) nachgewiesen, rechtes Bild der Abb. 1, x200.

55

[0083] Gliazellen, wie zum Beispiel Astrozyten, wurden durch Detektion von GFAP (glial fibrillary associated protein) (Primärantikörper 1 : 200 mit PBS verdünnt) nachgewiesen, linkes Bild der Abb. 1, x200.

[0084] Die Trennung von Neuronen und Gliazellen erfolgte durch spezifische Antikörper gegen MAP2 (Neurone) oder GFAP (Gliazellen), mittels MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) nach dem Verfahren, wie es beispielsweise in Carmiol S, Cell Isolation and Selection in Methods of Tissue Engineering, Academic Press 2002, Kapitel 2, Seiten 19-35 beschrieben ist.

[0085] Die mittels Anfärbung sichtbar gemachten Zelltypen sind in Abb. 1 gezeigt.

60

Beispiel 5

Herstellung von Endothelzellen aus dedifferenzierten programmierbaren adulten Stammzellen monozytären Ursprungs

65

[0086] Zur Züchtung von Endothelzellen wurde als Matrix Matrikel® (Beckton und Dickinson, Heidelberg, DE) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Matrix aus Fibronektin, Laminin und den Collagenen I und IV.

[0087] Die gefrorene Matrix wurde über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 4°C im Kühlschrank langsam aufgetaut.

Dabei änderte sich die Zustandsform, d. h. die ursprünglich feste Matrix wurde schwammig/flüssig. Sie wurde in diesem Zustand in eine 48-Loch-Platte (10 mm Durchmesser je Kammer) in solcher Weise aufgetragen, daß der Boden der jeweiligen Kammern bedeckt war.

[0088] Nach dem Auftragen wurde die Platte 30 Min. lang bei Raumtemperatur gehalten, bis sich das Gel auf dem Boden als adhäsente Schicht verfestigt hatte.

[0089] Anschließend wurden etwa 1×10^2 Zellen je Kammer mit Zusatz des Nährmediums (wie in Beispiel 2 beschrieben) auf Matrigel® inkubiert.

[0090] Nach 4–5 Tagen zeigten sich die ersten tubulären Zellstränge, die sich nach 6–8 Tagen in dreidimensionale Zellnetzwerke entwickelten. Auf den Zellen konnten die Endothelmarker CD31, und Faktor VIII mit den jeweils spezifischen Primärantikörpern (200 µl, jeweils 1 : 100 mit PBS verdünnt) nachgewiesen werden.

[0091] In einem alternativen Verfahren wurde die verflüssigte Matrix auf eine Gefäßprothese aufgetragen und diese anschließend mit den dedifferenzierten programmierbaren adulten Stammzellen gemäß Beispiel 2 beschichtet. Nach etwa 6 Tagen war ein Endothelrasen zu erkennen, der die Prothese zirkulär ausgekleidete.

[0092] Die durch Färbung mit entsprechenden Endothel-spezifischen Antikörpern (s. o.) sichtbar gemachten Endothelzellen sind in Abb. 2 gezeigt. Im mittleren Bild sind die Zellen nach 5 Tagen Inkubation auf Matrigel® dargestellt. Erste tubuläre Stränge verbinden einzelne Zellaggregate. Die dunkelbraun markierten Zellen exprimieren CD31-Antigen (x200 mit Gelbfilter). Nach 8 Tagen kommt es zunehmend zur Bildung von dreidimensionalen Netzwerkstrukturen (anti-CD31-Antigen-Färbung, x200 mit Gelbfilter). Nach 12 Tagen bilden die neu-differenzierten CD31⁺-Zellen, die auf Matrigel® gezüchtet wurden, eine Gefäßähnliche dreidimensionale Röhre mit mehrschichtigen Wandstrukturen aus, die bereits morphologisch an ein Gefäß erinnert. Man erkennt, daß nunmehr nahezu alle Zellen das CD31-Antigen exprimieren (CD31-Färbung, x400, Blaufilter), rechte Abbildung.

Beispiel 6

25 Herstellung von Fettzellen (Adipozyten)

A

[0093] Für die Programmierung/Differenzierung der adulten Stammzellen gemäß Beispiel 2 in Fettzellen wurde zunächst ein konditioniertes Medium generiert. Hierzu wurden 20 g eines autologen Fettgewebes, d. h. von Fettgewebe der gleichen Spenderperson, aus deren Blut auch die Monozyten stammten, wie folgt aufgearbeitet: Zunächst wurde das Fettgewebe in einer Petrischale zerkleinert und die zerkleinerten Gewebebrocken wurden durch ein Sieb (Durchmesser der Löcher 100 µm) passiert.

[0094] Die so erhaltene Suspension wurde anschließend in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 100 mm überführt und 10 ml DMEM-Medium mit einem Gehalt an 30 mg Collagenase Typ II hinzugefügt. Zur Einwirkung der Collagenase auf die Fettzellen wurde der Ansatz etwa 60 Min. lang bei Raumtemperatur (22°C ± 2°C) stehen gelassen.

[0095] Anschließend wurde das Gemisch in 50 ml Falconröhren überführt und die Röhren wurden 10 Min. lang bei 1800 rpm zentrifugiert.

[0096] Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das aus Adipozyten und Vorläuferzellen bestehende Zellpellet in 8 ml eines Mediums der folgenden Zusammensetzung aufgenommen und in Petrischalen (Durchmesser 100 mm) 10 Tage lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert:

DMEM - Lösung	444,5 ml
(FCS)	50 ml
Insulinlösung	0,5 ml
Penicillin (100 U/l) / Streptomycin (100 µg/l) Lösung	5 ml
Gesamtvolumen	500 ml

[0097] Die Insulinlösung enthielt 18 mg Insulin (SigmaI-0259) gelöst in 2 ml Essigwasser (bestehend aus 40 ml H₂O und 0,4 ml Eisessig). Die Lösung wird mit Essigwasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnt.

[0098] Während der 10 Tage dauernden Inkubation bildete sich das Fettzell-konditionierte Medium, FCCM als Überstand. Der Überstand wurde nach jeweils 2 bis 4 Tagen durch frisches Nährmedium ersetzt. Das jeweils beim Mediumwechsel gewonne FCCM wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert. Anschließend wurden 10 ml des oben beschriebenen FCCM mit etwa 10^6 Stammzellen gemäß Beispiel 2 in eine Petrischale (Durchmesser 100 mm) gegeben. Die ersten Fettvakuolen enthaltenden Vorläuferzellen wurden nach 4 Tagen sichtbar (Abb. 3A). Nach 6 Tagen erschienen vereinzelte, mit Sudan-Rot anfärbbare Adipozyten (Abb. 3B und C). Nach 10 Tagen kam es zur typischen Aggregation und Clusterbildung dieser Zellen, die in diesem Stadium bereits makroskopisch als Fettgewebe erkennbar wurden (Abb. 3D).

[0099] Die durch Anfärben sichtbar gemachten Fettzellen in den Abb. 3A-3D unterscheiden sich damit ganz wesentlich von den Kontrollen 3E und 3F: Abb. 3E zeigt die monozytären Ursprungszellen, die im Nährmedium (wie in Beispiel 2 angegeben) für 6 Tage gezüchtet wurden, jedoch ohne Zusatz von IL-3 und 2-Mercaptoethanol zu dem Nährmedium. Hiernach erfolgte die Zugabe des FCCM. Diese Zellen waren nicht in der Lage, in Fettzellen zu differenzieren. Abbildung F. zeigt Zellen, die 6 Tage lang mit komplettem Medium (gemäß Beispiel 2) kultiviert wurden, und die dann,

statt mit FCCM mit Nährmedium (gemäß Beispiel 2) für weitere 6 Tage behandelt wurden. Das FCCM enthält also Komponenten, die als Signalgeber für die Differenzierung in Fettzellen benötigt werden.

[0100] Das Färben der Zellen mit Sudan-Rot erfolgte nach der von Patrick Jr., C. W. et al., *Epithelial Cell Culture: Breast*, in *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press 2002, Kapitel 4, S. 141–149. 3A, B, C und D gezeigt.

5

B

[0101] Zusätzlich zur Phänotypisierung der Fettzellen durch Färbung mit Sudan-Rot erfolgte eine molekularbiologische Charakterisierung der Fettzellen auf mRNA-Ebene, um zu überprüfen, ob das genetische Programm der Fettzelle nach entsprechender Programmierung mit dem eingesetzten Fettzell-konditionierenden Medium eine entsprechende Alteration erfährt und typische, für Fettzellen beschriebene messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Transkripte in den aus programmierbaren Monozyten programmierten Fettzellen nachweisbar sind. Zwei für den Fettzellstoffwechsel typische mRNA-Sequenzen wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus isolierten RNA-Proben von dedifferenzierten programmierbaren Stammzellen monozytären Ursprungs und, in einem parallelen Versuchsansatz, aus den programmierten Fettzellen amplifiziert, nämlich "peroxisome proliferative activated receptor gamma" (PPARG) mRNA, (Ref. Tontonoz, P., et al. *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. *Cell* 79, 1147–1156, 1994), Genbank Zugangscodenummer; NM_005037) und "leptin (obesity homolog, mouse)" mRNA, (Rf. Zhang Y., et al. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature* 372, 425–432, 1994), Genbank, Zugangscodenummer: NM_000320).

10

[0102] Die hierfür notwendige RNA-Isolierung, die reverse Transkriptionsmethodik und die Bedingungen der PCR-Amplifikation der gewünschten mRNA-Sequenzen wurden wie im Stand der Technik detailliert beschrieben, durchgeführt, s. hierzu, Ungefroren H., et al., "Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis", *Cancer Res.* 58, 1741–1749 (1998).

20

[0103] Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen zur PCR-Amplifikation hergestellten Primer so ausgewählt, daß der forward and reverse Primer an mRNA Sequenzen binden, deren homologe Bereiche im chromosomal Gen in zwei verschiedenen Exons liegen und durch ein großes Intron voneinander getrennt sind. Hierdurch konnte sichergestellt werden, daß das erhaltene Amplifikationsfragment von der in der Zelle enthaltenen mRNA und nicht von der in der chromosomal DNA vorhandenen Sequenz stammt. Im Einzelnen wurde für PPAR- γ und für Leptin folgende Primersequenzen ausgewählt:

25

[0104] PPAR- γ : forward-primer; 265–288 (korespondierende Gensequenz in Exon 1), reverse-primer: 487–465 (korespondierende Gesequenz in Exon 2), damit ergibt sich ein Amplifikationsfragment von 487 – 265 bp = 223 bp, s. Abb. 3G. Wie ferner aus Abb. 3G ersichtlich, sind Spuren an transkribierter PPAR- γ -spezifischer mRNA bereits in der programmierbaren Stammzelle und in der Tumorzelllinie HL-60 (einer humanen promyeloischen Leukämie-Zelllinie) nachweisbar, allerdings mit signifikant geringerer Signalbande als in der Fettzelle selbst. Dagegen läßt sich das Fettzell-spezifische Protein Leptin nur in den aus der programmierbaren Stammzellen abgeleiteten Fettzellen auf mRNA-Ebene durch reverse-Transkriptase-PCR nachweisen.

30

[0105] Die zur Kontrolle eingesetzten programmierbaren Stammzellen (progr. Stammzelle) und die humanen Tumorzelllinien HL-60, Panc-1 und WI-38 transkribieren kein Leptin. Als Negativkontrollen wurden alle Ansätze ohne Zusatz der reversen Transkriptase (Fettzelle/-RT) und H₂O-Proben simultan mitbestimmt. Durch Nachweis des GAPDH-house-keeping Gens in den Positivkontrollen ist sichergestellt, daß die jeweiligen PCR-Amplifizierungsschritte in den Einzel-ansätzen ordnungsgemäß durchgeführt wurden.

40

Beispiel 7

Herstellung von Leberzellen (Hepatozyten)

45

A

[0106] Für die Programmierung der dedifferenzierten programmierbaren Stammzellen monozytären Ursprungs gemäß Beispiel 2 in Leberzellen wurde zunächst ein konditioniertes Medium generiert. Hierzu wurden 40 g humanes Lebergewebe wie folgt aufgearbeitet.

50

[0107] Zunächst wurde das Lebergewebe mehrmals in PBS gespült, um es weitestgehend von Erythrozyten zu befreien. Anschließend wurde das Gewebe in einer Petrischale zerkleinert und mit einer Dissoziationslösung etwa 45 Min. lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dissoziationslösung bestand aus 40 ml PBS (Phosphate buffered sahne), 10 ml einer 1 : 10 mit PBS verdünnten Trypsinlösung und 30 mg Collagenase Typ II (Rodbel M., et al. *J. Biol Chem* 239; 375, 1964). Nach 45minütiger Inkubation wurden die Gewebebrocken durch ein Sieb (s. Beispiel 6) passiert.

55

[0108] Anschließend wurde das Gemisch in 50 ml Falconrörchen überführt, bis auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und 10 Min. lang bei 1800 rpm zentrifugiert.

[0109] Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das die Leberzellen enthaltende Zellpellet wurde erneut mit 50 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde wiederum verworfen und das Zellpellet in 25 ml eines Mediums der folgenden Zusammensetzung aufgenommen und in Zellkulturflaschen (250 ml Volumen) 10 Tage lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert:

60

65

(Livercell-growth-medium, LCGM)	
5	RPMI 1640 Medium
	Foetales Kälberserum (FCS)
	Penicillin/Streptomycin-Lag.
10	Insulinlösung
	Gesamtvolumen
	445 ml
	50 ml
	5 ml
	0,5 ml
	500 ml

15 [0110] Das Nährmedium enthielt zusätzlich 5 µg (10 ng/ml Epidermal growth factor (Pascall, I. C., et al., 1994, J. Mol. Endocrinol. 12, 313). Die Zusammensetzung der Insulinlösung wurde in Bsp. 6 beschrieben.

[0111] Während der 10 Tage dauernden Inkubation bildete sich das Leberzell-konditionierte Medium, LCCM als Überstand. Der Überstand wurde nach jeweils 2 bis 4 Tagen durch frisches Nährmedium ersetzt. Das jeweils beim Mediumwechsel gewonnene LCCM wurde steril filtriert (Filter mit 0,2 µm Porengröße) und bei -20°C gelagert.

20 [0112] 1×10^6 dedifferenzierte Stammzellen wurden dann mit 10 ml eines Mediums der folgenden Zusammensetzung in einer Petrischale (Ø 100 mm) oder einer Kulturflasche kultiviert.

Leberzell-Differenzierungs-Medium

25 (Livercell-differentiation medium, LCDM):	
	LCCM
	Insulinlösung (Bsp.6)
30	"Epidermal growth factor"
	"Hepatocyte growth factor"
	100 ml
	0,1 ml
	1 µg
	70 ml

35 [0113] "Hepatocyte growth factor" [Kobayashi, Y. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 220, 7, (1996)] wurde in der Konzentration 40 ng/ml eingesetzt. Nach einigen Tagen konnten morphologische Veränderungen zu flachen, polygonalen mono- oder diploiden Zellen beobachtet werden (Abb. 4A). Nach 10–12 Tagen konnten aus dedifferenzierten Stammzellen entstandene Hepatozyten durch einen immunhistochemischen Nachweis des leberspezifischen Antigens "Alpha-Fetoprotein" identifiziert werden (Jacobsen et al., Am. J. Surg. Pathol. 1981; 5: 257–66), wie auf den Abb. 4B und 4C gezeigt.

40 B

45 [0114] Zusätzlich zur Phänotypisierung der Hepatozyten durch immunhistochemischen Nachweis des Alpha-Fetoproteins erfolgte eine molekularbiologische Charakterisierung der Hepatozyten auf mRNA-Ebene um zu überprüfen, ob das genetische Programm der Stammzellen nach entsprechender Programmierung mit dem eingesetzten Leberzell-konditionierenden Medium eine entsprechende Alteration erfährt und als typisch für Leberzellen beschriebene messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) in den aus den erfundungsgemäßen Stammzellen hervorgegangenen Hepatozyten nachweisbar sind. Zu diesem Zweck wurde das Vorhandensein von fünf verschiedenen, für Hepatozyten typischen mRNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in isolierten RNA-Proben aus dedifferenzierten programmierbaren Stammzellen monozytären Ursprungs und, in einem parallelen Versuchsansatz, aus den durch Programmieren der Stammzellen erhaltenen Leberzellen untersucht. Im einzelnen handelt es sich um "Homo sapiens albumin mRNA", [Ref. Lawn, R. M. et al. The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in E. coli. Nucleic Acids Res. 9, 6103–6114, (1981)], Genbank Zugangscodenummer: NM-000477; "alpha-fetoprotein mRNA" [Ref. Morinaga T, et al. Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4604–4608, (1983)], Genbank Zugangscodenummer: V01514; "Human carbamyl phosphate synthetase I mRNA" [Ref. Haraguchi, Y, et al., Cloning and sequence of a cDNA encoding human carbamyl phosphate synthetase I: molecular analysis of hyperammonemia, Gene 107, 335–340 (1991)], Genbank Zugangscodenummer D90282, "Homo sapiens coagulation factor II" (Thrombin, F2) mRNA [Ref. Degen, S. J. et al. Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin, Biochemistry 22, 2087–2097, (1983)], Genbank Zugangscodenummer NM-000506; "Homo sapiens coagulation factor VII" (serum prothrombin conversion accelerator, F7) mRNA [Ref. NCBI Annotation Project. Direct Submission, 06-Feb-2002, National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA] Genbank Zugangscodenummer XM-027508.

55 [0115] Die hierfür notwendige RNA-Isolierung, die reverse Transkriptionsmethodik und die Bedingungen der PCR-Amplifikation der gewünschten mRNA-Sequenzen wurden wie im Stand der Technik detailliert beschrieben durchgeführt, siehe hierzu Ungefroren H. et al. "Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis", Cancer Res. 58, 1741–1749 (1998).

60 [0116] Die jeweiligen Primer zur PCR-Amplifikation wurden so ausgewählt, daß der "forward" und "reverse" Primer an mRNA-Sequenzen binden, deren homologe Bereiche im chromosomal Gen in zwei verschiedenen Exons liegen

und durch ein großes Intron voneinander getrennt sind. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, daß das erhaltene Amplifikationsfragment von der in der Zelle enthaltenen mRNA und nicht von der in der chromosomal DNA vorhandenen Sequenz stammt.

[0117] Es wurden die nachfolgend angegebenen Primersequenzen ausgewählt; die Ergebnisse der jeweiligen PCR Analysen sind in Abb. 4D wiedergegeben. Die erfindungsgemäßen dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen sind dort als "progr. Stammzelle" und die durch Programmieren von diesen abgeleiteten Hepatozyten als "progr. Hepatozyt" bezeichnet.

– Alpha-Foetoprotein: forward-primer: 1458–1478 (korrespondierende Gensequenz in Exon 1), reverse-primer: 1758–1735 (korrespondierende Gensequenz in Exon 2), damit ergibt sich ein Amplifikationsfragment von 1758–1458 bp = 391 bp, siehe Abb. 4D. 10

Wie Abb. 4 zeigt, läßt sich die programmierbare Stammzelle (progr. Stammzelle), in der selbst keine spezifischen mRNA-Transkripte für Alpha-Fötoprotein nachweisbar sind, in einen Hepatozyten programmieren (progr. Hepatozyt), der dieses mRNA-Transkript enthält (positive Bande mit dem Molekulargewicht von 301 bp). Hieraus erklärt sich auch die immunhistochemische Nachweisbarkeit des Alpha-Fötoproteins, wie auf den Abb. 4B und 4C gezeigt. Die Positiv-Kontrollen, namentlich humanes Lebergewebe und die Lebertumorzelllinie HepG2 transkribieren ebenfalls Alphafötoprotein-spezifische mRNA, wie die Banden von 301 bp bestätigen. 15

– Albumin: "forward-primer": 1450–1473 (korrespondierende Gensequenz in Exon 1), "reverse-primer": 1868–1844 (korrespondierende Gensequenz in Exon 2), damit ergibt sich ein Amplifikationsfragment von 1868 – 1450 bp = 419 bp, siehe Abb. 4D. 20

Abb. 4D zeigt Spuren an transkribierter Albumin-spezifischer mRNA bereits in der programmierbaren Stammzelle, während die durch Programmieren der Stammzellen erhaltenen Hepatozyten, sowie die positiv-Kontrollen, nämlich normales Lebergewebe und die Tumorzelllinie HepG2 starke Banden exprimieren.

– Carbamoylphosphat Synthetase I: forward-primer 3135–3157 (korrespondierende Gensequenz in Exon 1), reverse-primer: 4635–4613 (korrespondierende Gensequenz in Exon 2), damit ergibt sich ein Amplifikationsfragment von 4635 – 3135 = 1500 bp, siehe Abb. 4D. 25

Die Carbamoylphosphat Synthetase I stellt ein für den Hepatozyten spezifisches Enzym dar, welches eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von Harnstoff im sogenannten Harnstoffzyklus übernimmt. Diese Entgiftungsfunktion wird durch funktionsfähige Hepatozyten gewährleistet. Wie Abb. 4D belegt, lassen sich sowohl in den aus programmierbaren Stammzellen generierten Hepatozyten als auch in den Positiv-Kontrollen (aus humanem Lebergewebe und die HepG2 Tumorzelllinie) die spezifischen mRNA-Banden (1500 bp) für Carbamoylphosphat Synthetase I nachweisen. Die etwas schwächere Expression der mRNA Bande für die programmierten Hepatozyten (progr. Hepatozyt) erklärt sich durch das fehlende Substratangebot in der Kulturschale. 30

– Gerinnungsfaktor II: forward-primer 1458–1481 (korrespondierende Gensequenz in Exon 1), reverse-primer: 1901–1877 (korrespondierende Gensequenz in Exon 2), damit ergibt sich ein Amplifikationsfragment von 1901 – 1458 = 444 bp, siehe Abb. 4D. 35

Dieses ebenfalls Hepatozyten-spezifische Protein läßt sich lediglich in den programmierten Hepatozyten (progr. Hepatozyt) und in der Positiv-Kontrolle aus humanem Lebergewebe auf mRNA-Ebene durch Bandenexpression bei 444 bp nachweisen, wogegen die programmierbare Stammzelle (progr. Stammzelle) diese Bande nicht zeigt, d. h. das Gen wird dort nicht transkribiert, wie in Abb. 4D gezeigt. 40

– Gerinnungsfaktor VII: forward-primer 725–747 (korrespondierende Gensequenz in Exon 1), reverse-primer: 1289–1268 (korrespondierende Gensequenz in Exon 2), damit ergibt sich ein Amplifikationsfragment von 1289 – 725 = 565 bp, siehe Abb. 4D.

Ebenso wie der Gerinnungsfaktor II wird auch dieses Protein lediglich in programmierten Hepatozyten (progr. Hepatozyt) und in der Positivkontrolle (humanes Lebergewebe) transkribiert (siehe Banden bei 656 bp), wenn auch schwächer als der Gerinnungsfaktor II. Weder die programmierbare Stammzelle noch die Negativkontrolle (H_2O) zeigen diese spezifische mRNA-Bande. 45

– Glyzerinaldehyd-dehydrogenase: Dieses auch als "housekeeping gene" bezeichnete Gen läßt sich in jeder eukaryotischen Zelle nachweisen und dient als Kontrolle einer in allen Proben ordnungsgemäß durchgeführten PCR-Amplifikation, die parallel mitbestimmt wird und durch Zugabe einer definierten Menge an RNA aus den jeweiligen Zellproben zustande kommt. 50

– Als Negativkontrollen wurde in allen Ansätzen H_2O -Proben simultan mitbestimmt. Da H_2O keine RNA enthält, wird auch nichts amplifiziert und die Bande bleibt aus (dient damit als Gegenkontrolle).

Beispiel 8

55

Herstellung von Hautzellen (Keratinozyten)

[0118] Für die Programmierung der dedifferenzierten programmierbaren Stammzellen monozytären Ursprungs gemäß Beispiel 2 in Hautzellen wurde zunächst ein konditioniertes Medium generiert. Hierzu wurde 1–2 cm² humane Vollhaut wie folgt aufgearbeitet. 60

[0119] Das Hautmaterial wurde zunächst unter sterilen Bedingungen von der Subcutis befreit. Das Gewebe wurde nun insgesamt 10x mit PBS in einem sterilen Behälter durch kräftiges Schütteln gewaschen. Nach der 2. Waschung wurde das Gewebe nochmals von demarkierten Bindegewebsresten befreit.

[0120] Danach wurde das Hautmaterial in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 60 mm gegeben, dort mit 3 ml einer 1 : 10 mit PBS verdünnten Trypsinlösung versetzt und in kleine Stücke (etwa 0,5 bis 1 mm³) geschnitten. Danach wurden dem Gemisch erneut 3 ml der 1 : 100 mit PBS verdünnten Trypsinlösung zugesetzt und die Mischung wurde bei 37°C 60 Minuten lang unter intermittierendem Schütteln inkubiert. 65

[0121] Danach ließ man die größeren Partikel sedimentieren und der die Keratinozyten enthaltende Überstand wurde abgegossen und bei 800 rpm 5 min. lang zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurde abpipettiert und das Zell-pellet in 3 ml eines Mediums der folgenden Zusammensetzung aufgenommen und in Petrischalen (Ø 100 mm) 15 Tage lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

5

Keratinocyten-Wachstums-Medium

(Keratinocyte-growth-medium, KGM):

10	DMEM	333 ml
15	Foetales Kälberserum (FCS)	59 ml
20	Ham's F12 Medium	111 ml
25	Penicillin/Streptomycin-Lsg.	5 ml
30	Insulinlösung (Bsp.6)	0,5 ml
35	Gesamtvolumen	500 ml

[0122] Das Nährmedium enthielt 5 µg "Epidermal growth factor" (genaue Spezifizierung, s. Beispiel 7) und 5 mg Hydrocortison (Ref. Merck Index: 12, 4828).

[0123] Während der 15 Tage dauernden Inkubation bildet sich das Keratinozytenzell-konditionierte Medium KCCM als Überstand. Der Überstand wurde nach jeweils 2–4 Tagen durch frisches Nährmedium ersetzt. Das jeweils beim Mediumwechsel gewonnene KCCM wurde steril filtriert und bei –20°C gelagert.

[0124] 1×10^6 dedifferenzierte Stammzellen wurden dann mit 10 ml eines Mediums der folgenden Zusammensetzung in einer Petrischale 100 mm) oder einer Kulturflasche kultiviert.

Keratinocyten-Differenzierungs-Medium

(Keratinocyte-differentiation-medium, KDM)

30	KCCM	100 ml
35	Insulinlösung (Bsp.6)	0,5 ml
40	Epidermal growth factor (EGF)	1 µg
45	Hydrocortison	1 mg
50	Keratinocyte growth factor (KGF)	2,5 µg

[0125] Keratinocyte growth factor wurde in einer Konzentration von 25 ng/ml eingesetzt, wie beschrieben von Finch et al., 1996, Gastroenterology 110: 441.

[0126] Nach einigen Tagen konnte eine morphologische Veränderung der Zellen beobachtet werden. Nach 6 Tagen ließen sich die keratinozyten-spezifischen Antigene, Cytokeratin 5 und 6, die beide von dem verwendeten Primärantikörper gebunden werden, (Exp. Cell. Res. 1986, 162: 114) nachweisen (Abb. 5A). Nach 10 Tagen erfolgte bereits in Kultur eine Zelladhärenz der deutlich größeren Einzelzellen, die einen sichtbaren Zellgewebeverband konfluierender Zellen erkennen ließen (Abb. 5B).

Beispiel 9

50

In vivo Anwendung dedifferenzierter programmierte Stammzellen monozytären Ursprungs

[0127] Zur Abklärung, inwieweit die programmierbaren Stammzellen in vivo nach Injektion über die Pfortader in die Leber eines genetisch-identischen Empfängertieres durch die im Leberorgan vorhandenen Signalgeber eine spezifische Differenzierung erfahren, wurden Leberorgane weiblicher LEW-Ratten zunächst mit Retrorsin behandelt, um die in der Leber vorhandenen Hepatozyten (Leberparenchymzellen) in ihrer Proliferationsaktivität zu hemmen [Ref. Lacone E. et al. "Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine, Am J Path 153, 319–329, (1998)].

[0128] Zu diesem Zweck erhielten die LEW-Ratten 30 mg des Pyrrolizidin-Alkaloids Retrorsin, intraperitoneal zweimalig, innerhalb von 14 Tagen gespritzt. Anschließend erfolgte eine 80% Resektion der so vorbehandelten Lebern gefolgt von der Gabe von 5×10^5 der programmierbaren Stammzellen in 1 ml PBS in die Pfortader der verbliebenen Restleber. Die Stammzellen waren wie in Beispiel 2 beschrieben aus Monozyten männlicher LEW-Ratten gewonnen worden. 5 Tage nach Gabe der Stammzellen erfolgte eine Stanzbiopsie der Leber zur histologischen Beurteilung der Leber und zum Nachweis der aus den Stammzellen differenzierten Zelltypen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit Y-Chromosom spezifischen Sonden, wie ausführlich in Hoebee B., de Stoppelaar JM, et al. Isolation of rat chromosome-specific paint probes by bivariate flow sorting followed by degenerate oligonucleotide primed-PCR. Cytogenet Cell Genet 66: 277–282 (1994) beschrieben.

[0129] Abb. 7A zeigt die aus den männlichen LEW-Stammzellen abgeleiteten Y-Chromosom-positiven (rote Punkte

im Zellkern) Heptozyten am 5. Tage nach intraportaler Injektion in Retrorsin-vorbehandelte 80%-resezierte Leberorgane weiblicher Empfängertiere. Die selektive Entnahme der gleichen Leber am Tag 25 nach Stammzellinjektion zeigt die Differenzierung der Stammzellen in Hepatozyten, Endothelzellen und Gallengangsepithelien. Zu diesem Zeitpunkt hat die Lebergröße bereits wieder Normalgröße erreicht und > 90% der Zellen weisen ein Y-Chromosom auf. Hieraus kann gefolgert werden, daß die injizierten syngenen programmierbaren Stammzellen monozytären Ursprungs in der Lage sind, *in vivo* eine komplettne Wiederherstellung des Leberorgans mit normaler metabolischer Funktion zu bewerkstelligen. **Abb. 7C** zeigt hierzu die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier (n = 4 pro Gruppe), Stammzell-behandelter versus unbehandelter Empfängertatten nach Retrorsingabe und 80% Leberresektion.

[0130] Die Funktionsparameter Bilirubin und Ammoniak (NH₃) belegen die volle metabolische Funktion der langzeit überlebenden Stammzell-behandelten Tiere (Abb. 7D und 7E).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen humanen monozytären Ursprungs, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) Monozyten aus Human-Blut isoliert;
 - b) die Monozyten in einem geeigneten Kulturmedium vermehrt, welches den zellulären Wachstumsfaktor M-CSF enthält;
 - c) die Monozyten gleichzeitig mit oder im Anschluß an Stufe b) in einem IL-3 enthaltenden Kulturmedium kultiviert; und
 - d) die in Stufe c) gebildeten humanen adulten dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen gewinnt, indem man die Zellen von dem Kulturmedium abtrennt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man dem Kulturmedium in Stufe c) ferner eine Mercaptoverbindung zusetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mercaptoverbindung verwendet, in der mindestens eine Kohlenwasserstoffgruppe an den Schwefel gebunden ist, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe(n) mit einer oder mehreren weiteren funktionellen Gruppen substituiert sein kann (können).
4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Mercaptoverbindung 2-Mercaptoethanol oder Dimethylsulfoxid ist.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen im Anschluß an Stufe c) und vor Stufe d) mit einem biologisch verträglichen organischen Lösungsmittel in Kontakt bringt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das biologisch verträgliche organische Lösungsmittel ein Alkohol mit 1-4 Kohlenstoffatomen ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Alkohol Ethanol ist.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit der Dampfphase des biologisch verträglichen organischen Lösungsmittels in Kontakt bringt.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen im Anschluß an Stufe e) in einem geeigneten Zellkulturmedium suspendiert.
10. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium RPMI oder DMEM ist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium ein Zytokin oder LIF enthält.
12. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen in einem flüssigen Medium suspendiert und anschließend tiefgefriert.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium ein Zellkulturmedium ist.
14. Dedifferenzierte, programmierbare Stammzellen humanen monozytären Ursprungs.
15. Stammzellen nach Anspruch 14, erhältlich nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 13.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend die dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen nach den Ansprüchen 14 oder 15.
17. Verwendung der dedifferenzierten, programmierbaren Stammzellen nach den Ansprüchen 14 oder 15, zur Herstellung von Zielzellen und Zielgewebe.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) die gewünschten Zielzellen enthaltendes Gewebe zerkleinert;
 - b) die Zielzellen und/oder Fragmente derselben aus dem zerkleinerten Gewebe gewinnt;
 - c) die Zielzellen und/oder Fragmente derselben in einem geeigneten Kulturmedium inkubiert;
 - d) den Überstand des Kulturmediums während und nach der Inkubation als Zielzell-konditioniertes Medium sammelt; und
 - e) zum Reprogrammieren/Differenzieren der Stammzellen in die gewünschten Zielzellen die Stammzellen in Gegenwart des Zielzell-konditionierten Mediums wachsen läßt.
19. Verwendung nach den Ansprüchen 17 oder 18 zur Herstellung von Adipocyten.
20. Verwendung nach den Ansprüchen 17 oder 18 zur Herstellung von Neuronen und Gliazellen.
21. Verwendung nach den Ansprüchen 17 oder 18 zur Herstellung von Endothelzellen.
22. Verwendung nach den Ansprüchen 17 oder 18 zur Herstellung von Keratinocyten.
23. Verwendung nach den Ansprüchen 17 oder 18 zur Herstellung von Hepatozyten.
24. Verwendung nach den Ansprüchen 17 oder 18 zur Herstellung von Inselzellen.

Hierzu 11 Seite(n) Zeichnungen

Abbildung 1 Differenzierung in Neurone und Gliazellen

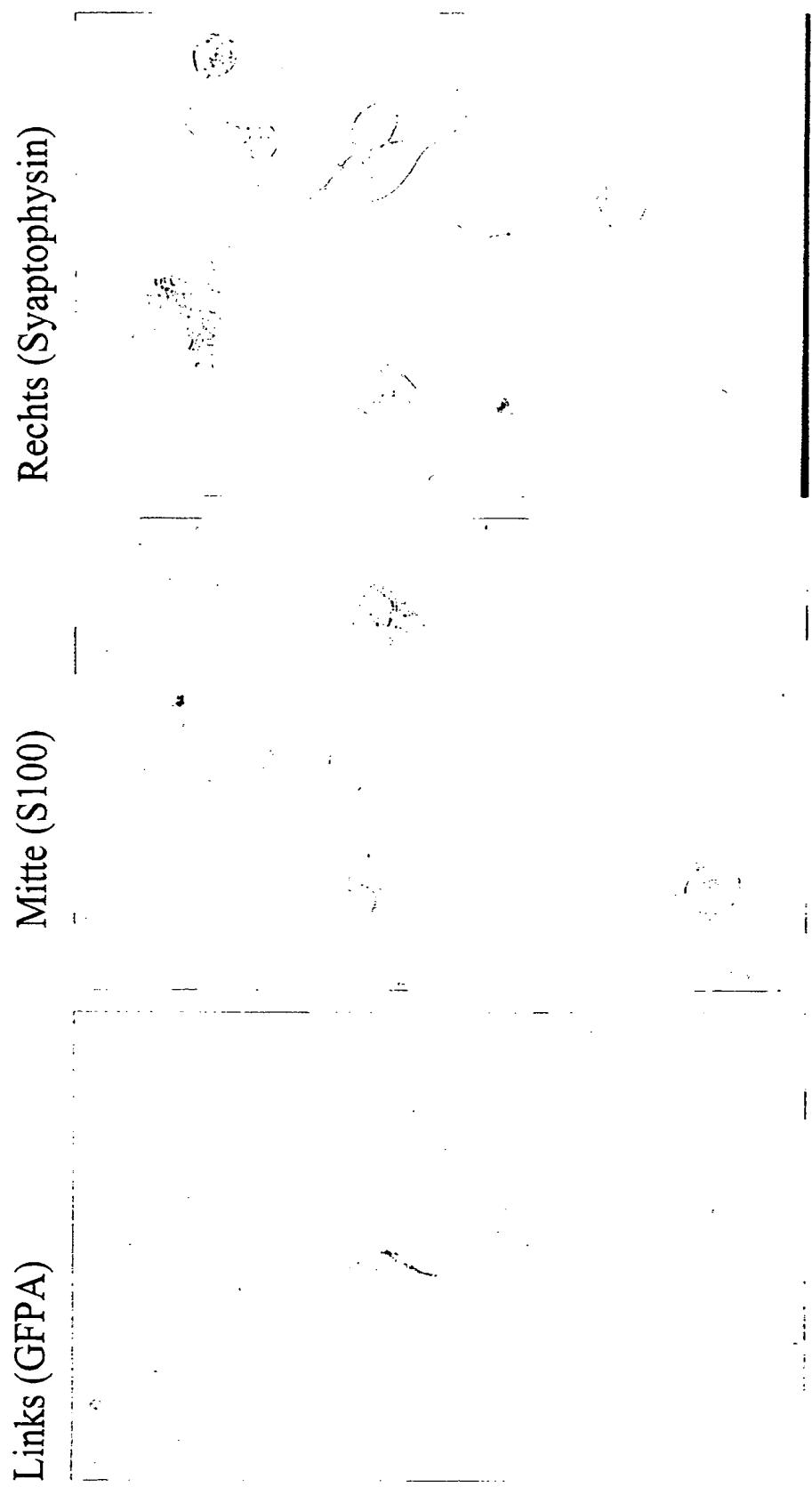
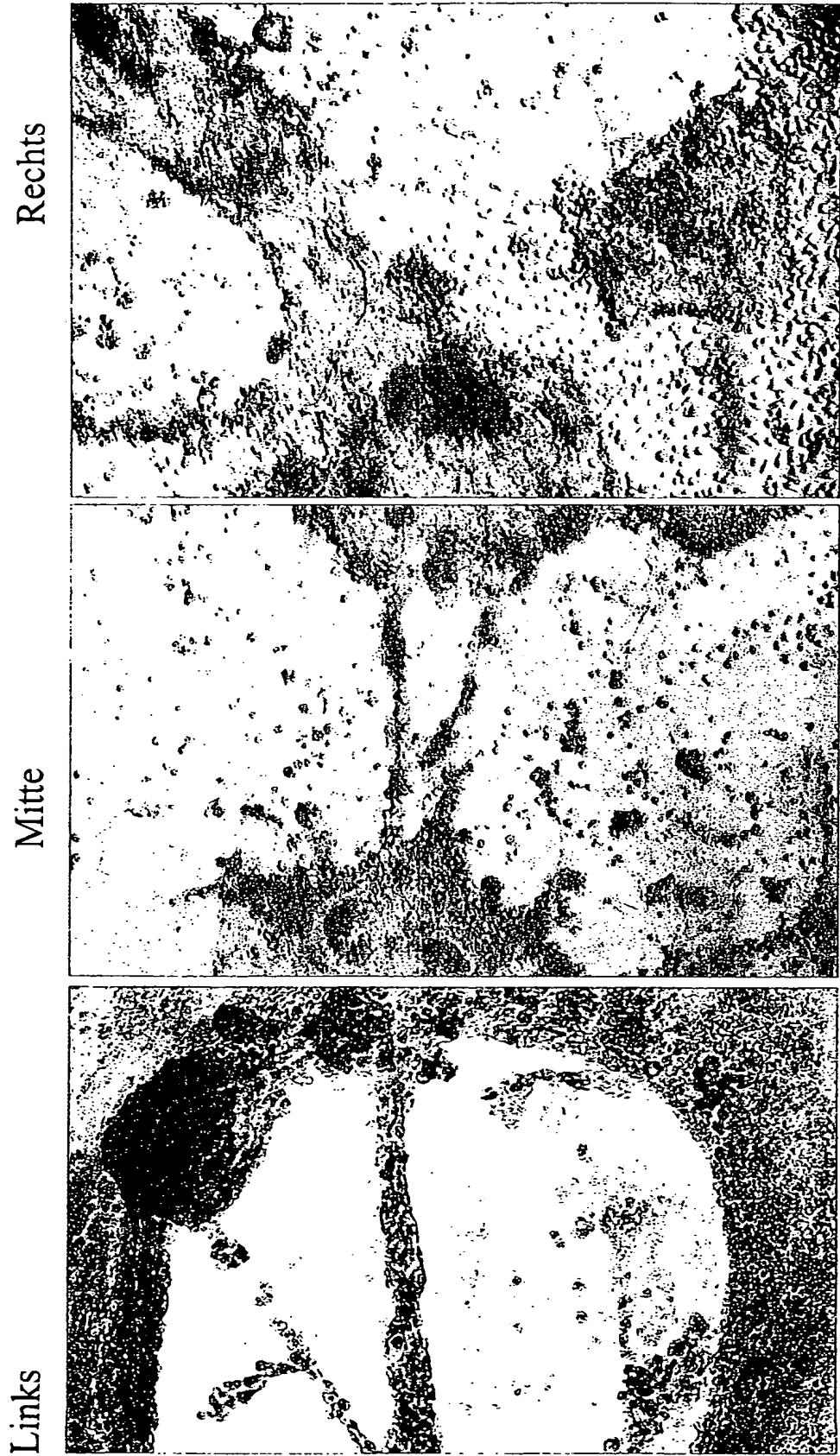


Abbildung 2 Differenzierung in Endothelzellen



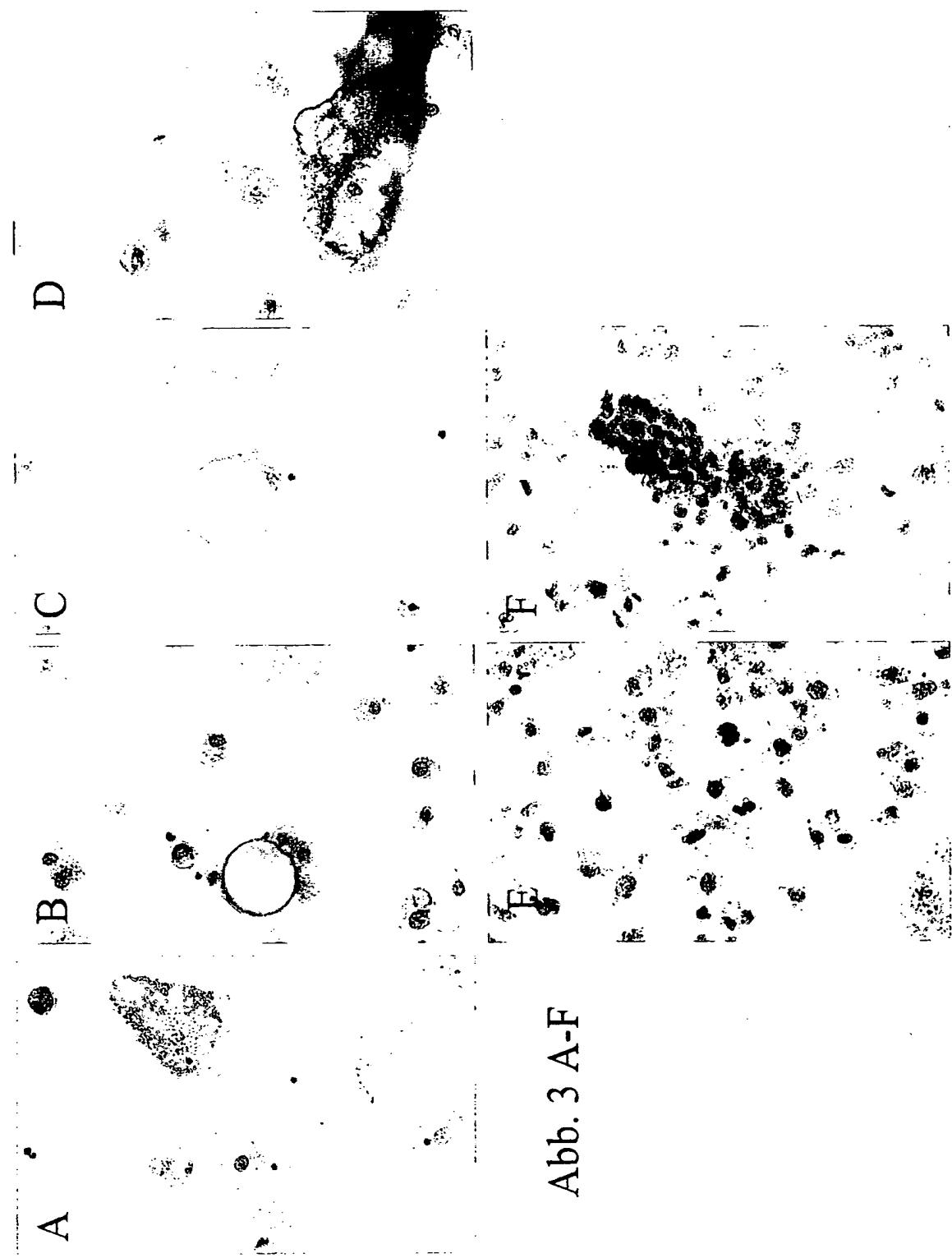
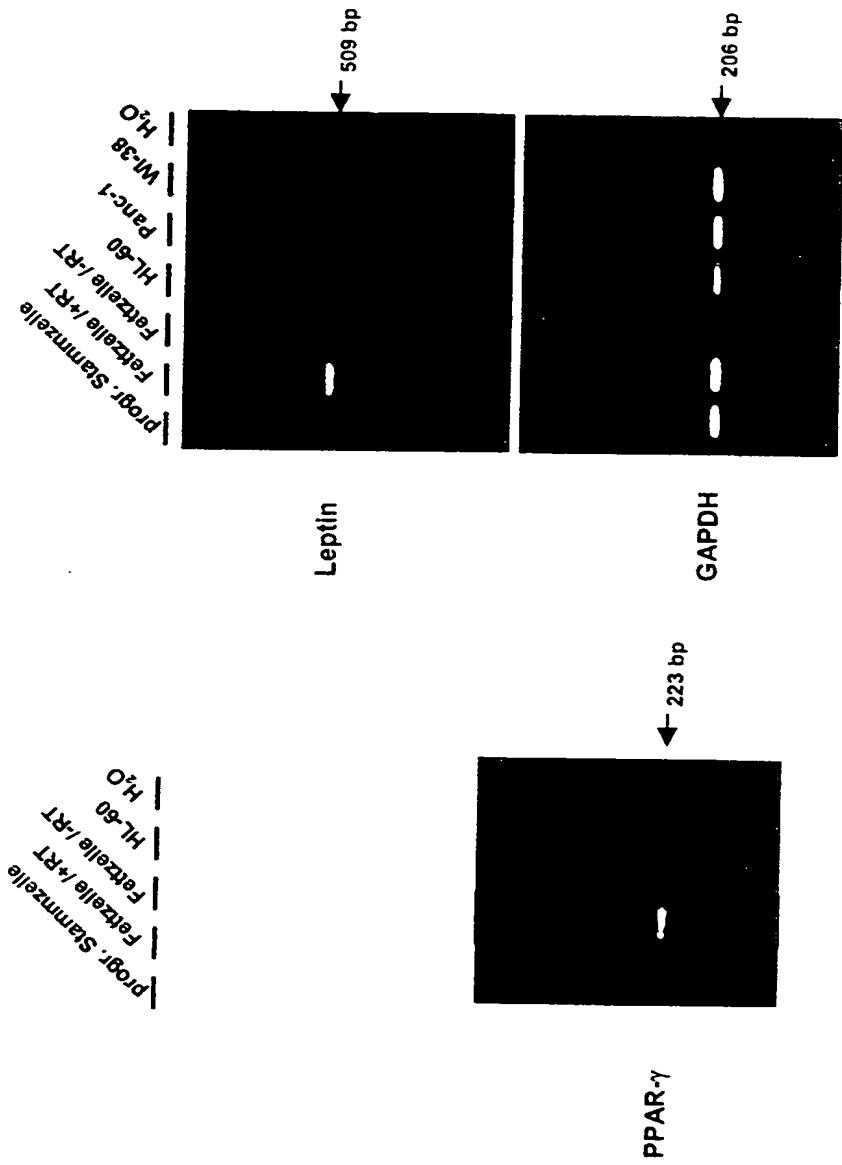


Abb. 3 A-F

Abb. 3G / RT-PCR Analyse von Adipozyten-spezifischen Genen in monozytären programmierbaren Stammzellen und daraus programmierten Fettzellen



HL-60 = humane promyeloische Leukämie-Zelllinie

Panc-1 = humane Pankreasadenokarzinom-Zelllinie

WI-38 = humane embryonale Lungenfibroblasten-Zelllinie (nicht transformiert)

Alpha-foto-protein-positive Hepatozyten aus programmierbaren
Stammzellen monozytären Ursprungs abgeleitet

Abb. 4A Tag 6 nach Kultivierung
der Stammzelle mit LCGM

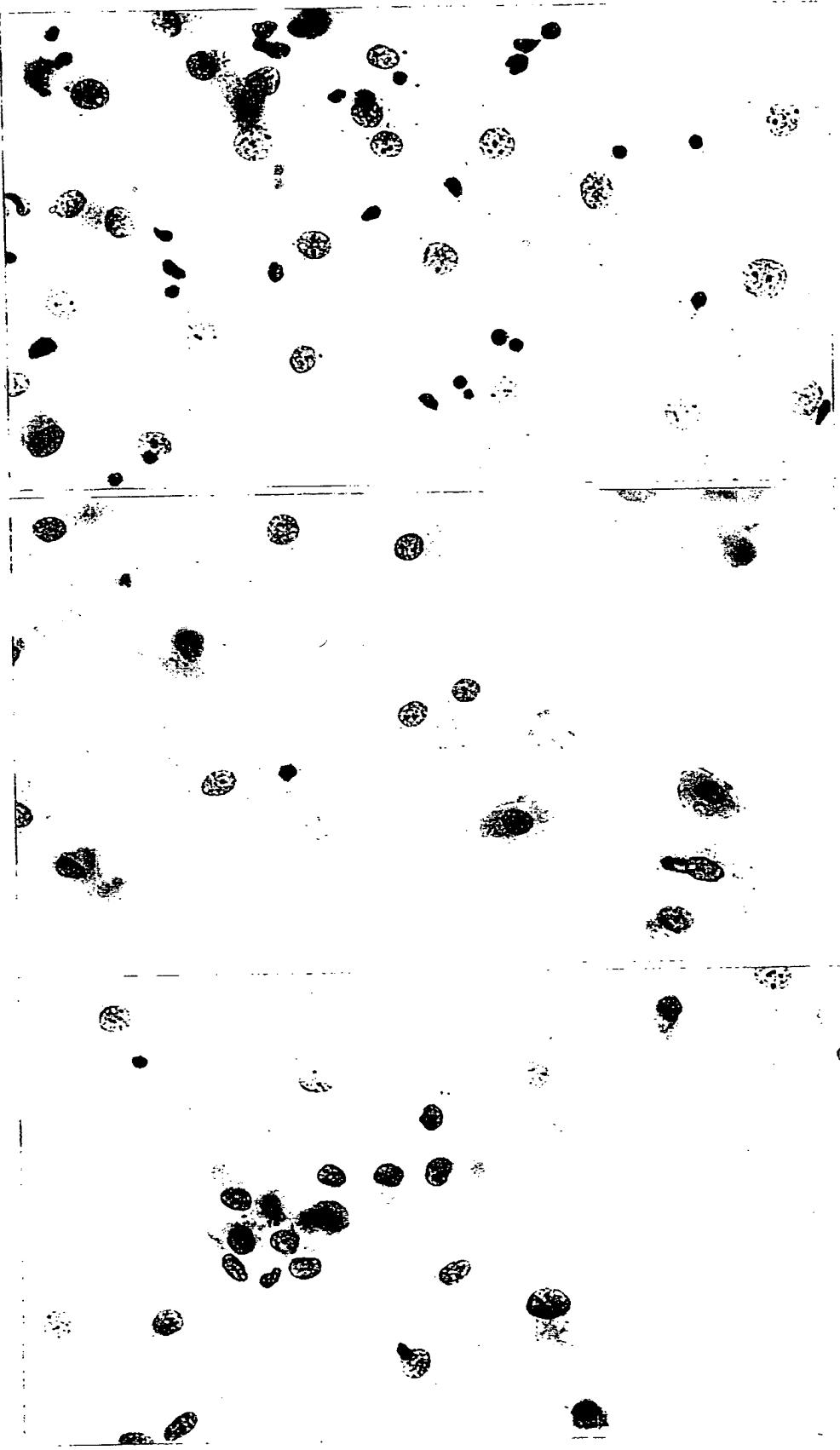


Abb. 4B Tag 10 nach Kultivierung
der Stammzelle mit LCGM

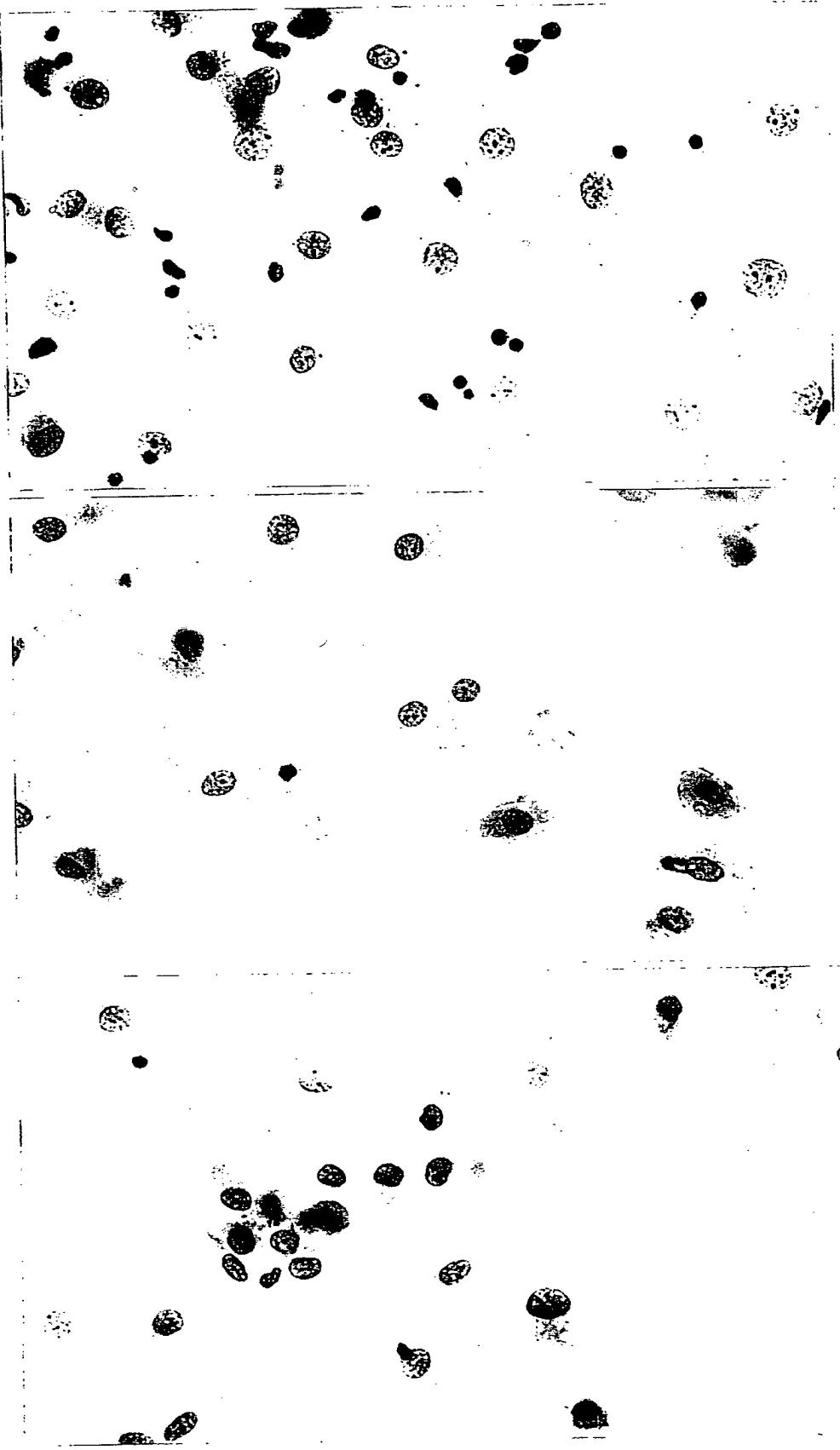


Abb. 4C Tag 12 nach Kultivierung
der Stammzelle mit LCGM

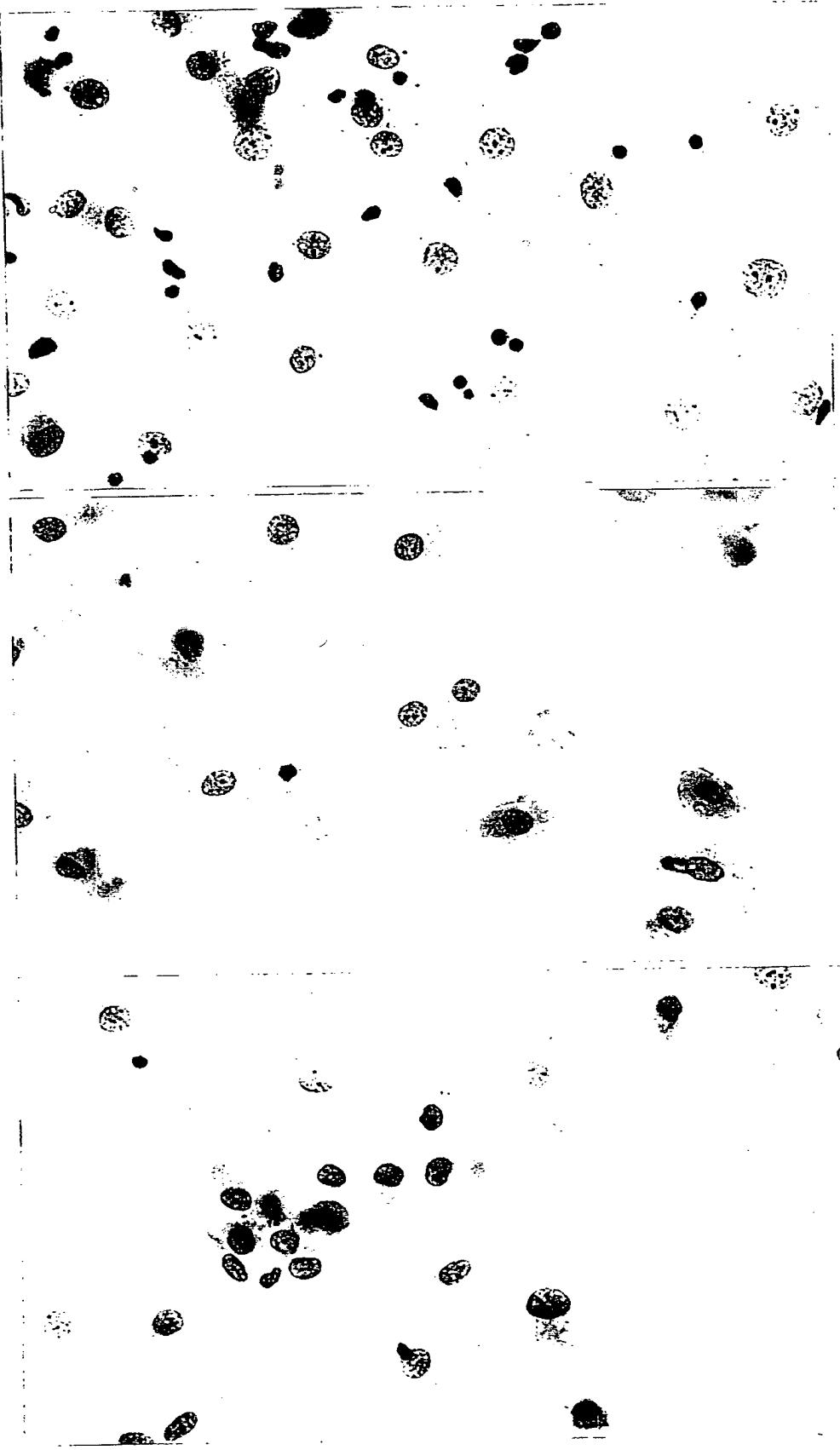
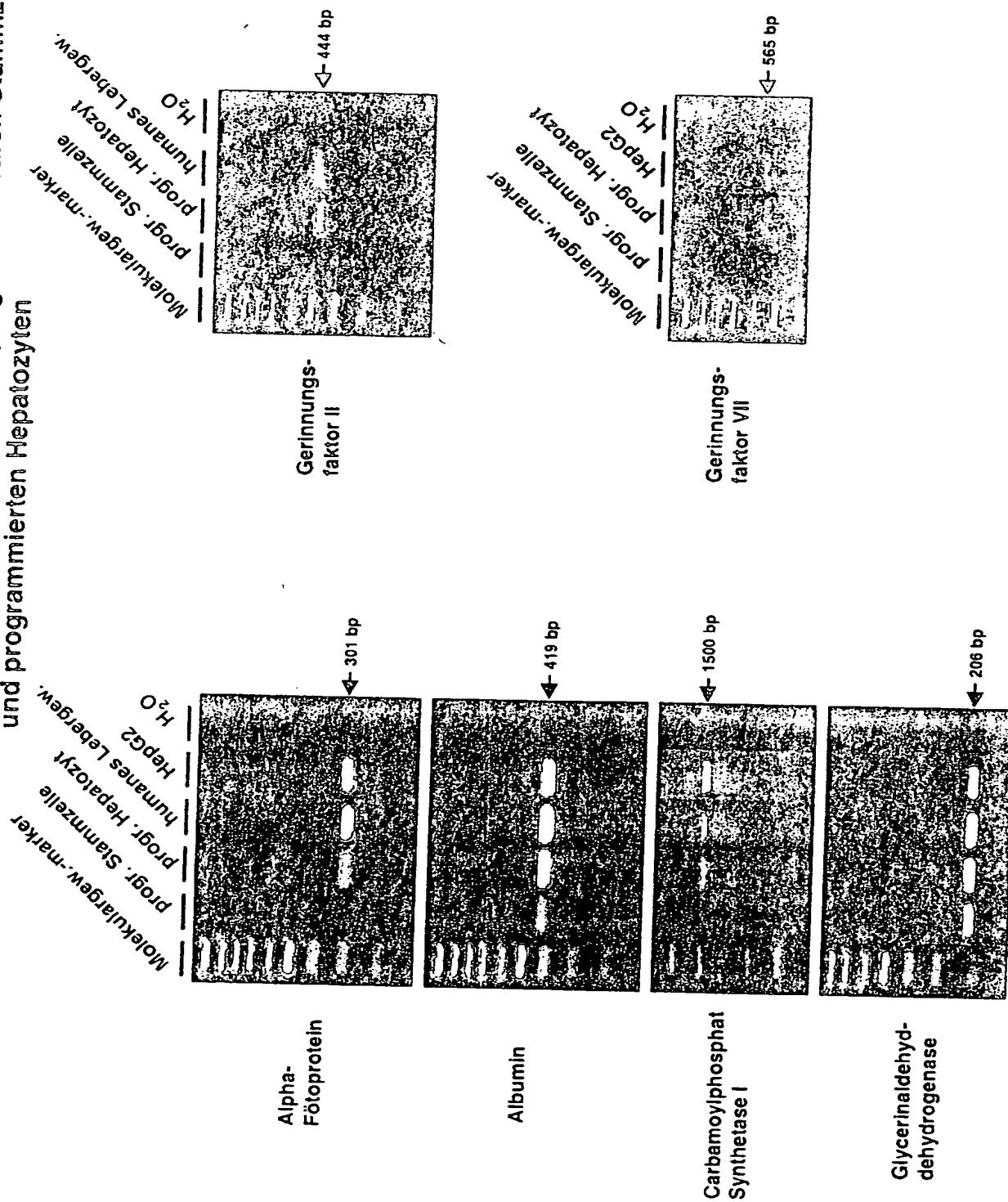


Abb. 4D RT-PCR Analyse von Hepatozyten-spezifischen Genen in programmierbaren Stammzellen und programmierten Hepatozyten



Aus programmierbaren Stammzellen monozytären Ursprungs
abgeleitete Zytokeratin 5 und 6 positive Keratinozyten

Abb. 5A Tag 6 nach Behandlung mit KCCM
Keratinozytenzell-konditioniertes Medium

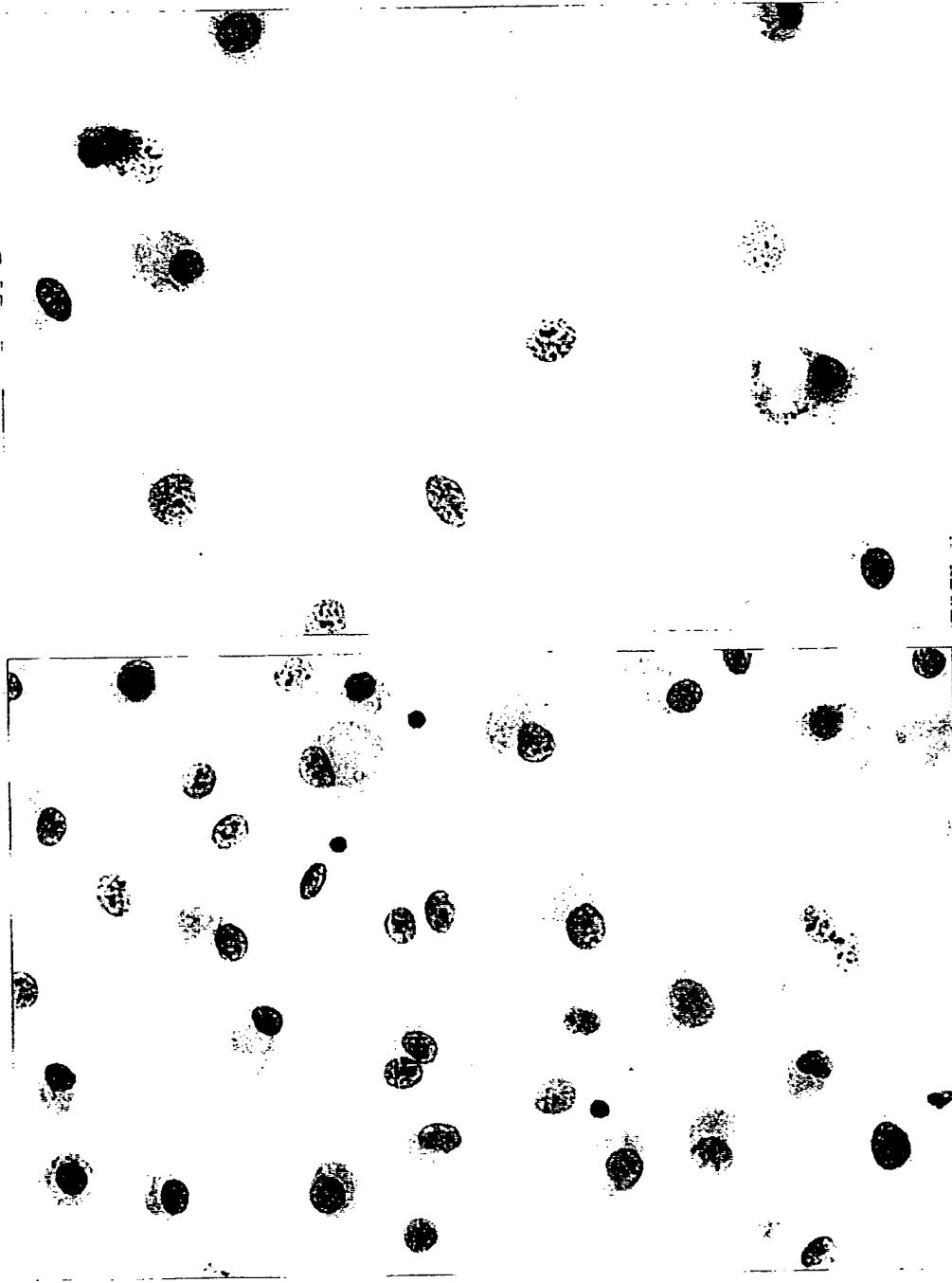
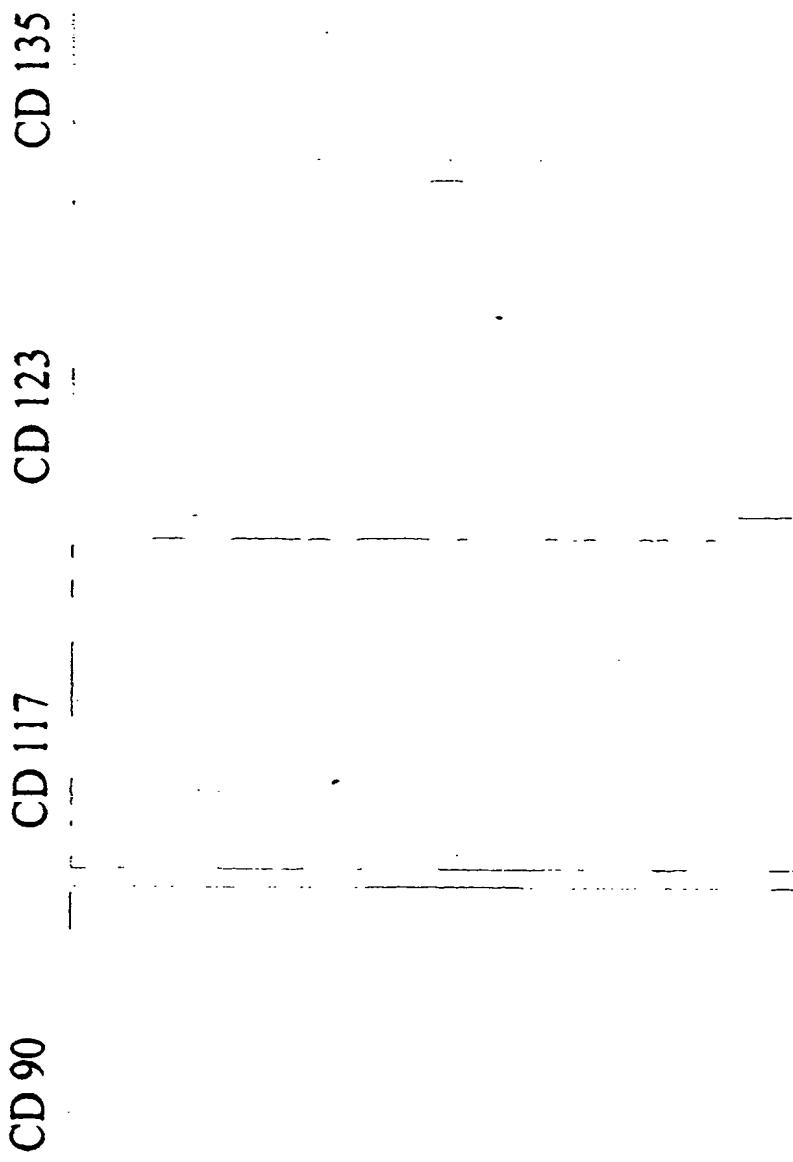


Abb. 5B Tag 10 nach Behandlung mit KCCM
Keratinozytenzell-konditioniertes Medium

Stammzellmarker, dedifferenzierter programmiertbarer
Stammzellen monozytären Ursprungs



Die entsprechend der Beschreibung hergeleiteten dedifferenzierten programmbaren Stammzellen zeigen einfach-positive CD117 Expression und starke Positivität mit den Stammzellmarkern CD90, CD123 und CD135

Abb. 6

Abb. 7A FISH-Y-Chromosom-Nachweis Stammzell-abgeleiteter Hepatozyten



Abb. 7B FISH-Y-Chromosomnachweis Stammzell-abgeleiteter Hepatozyten (↑)
Endothel- (↑) und Gallengangszellen (↑)



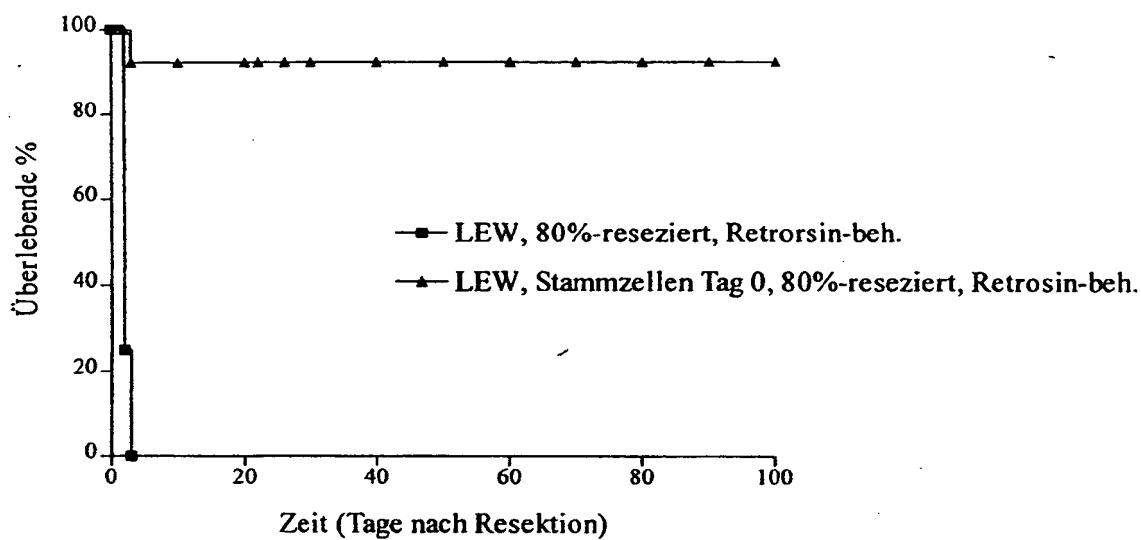


Abb. 7C

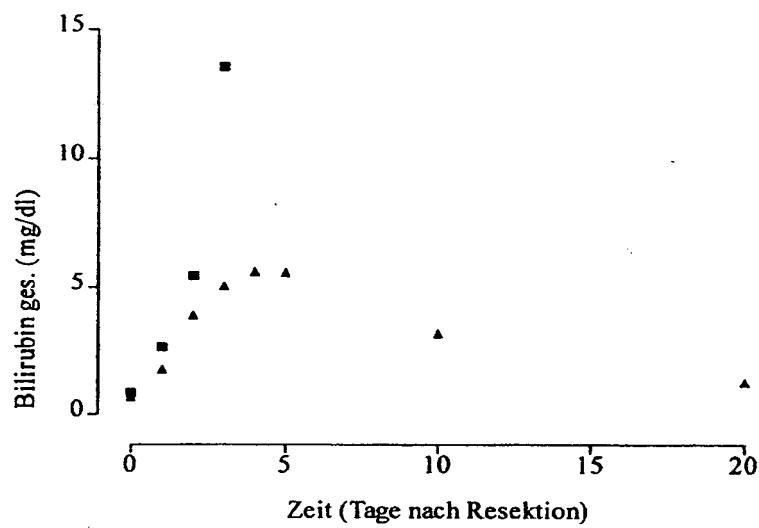


Abb. 7D

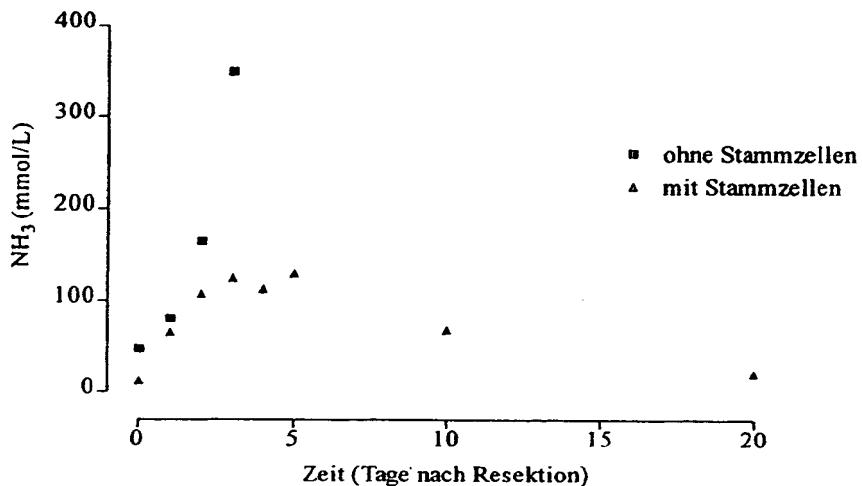


Abb. 7E

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING
107420 XMA 10 324 DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)